

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**MIOCARDIO HIBERNADO: CARACTERIZACIÓN
CON IMAGEN MULTIMODAL DE UN MODELO DE
ANIMAL GRANDE Y ESTUDIO PILOTO DEL PAPEL
TERAPÉUTICO DE DIETA RICA EN GRASA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR:

Juan Martínez Milla

Director:

Borja Ibáñez Cabeza

Madrid, 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**MIOCARDIO HIBERNADO: CARACTERIZACIÓN
CON IMAGEN MULTIMODAL DE UN MODELO DE
ANIMAL GRANDE Y ESTUDIO PILOTO DEL PAPEL
TERAPÉUTICO DE DIETA RICA EN GRASA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR:

Juan Martínez Milla

Director:

Borja Ibáñez Cabeza

TÍTULO:

Miocardio hibernado: caracterización con imagen multimodal de un modelo de animal grande y estudio piloto del papel terapéutico de dieta rica en grasa

DOCTORANDO:

D. Juan Martínez Milla

LUGAR DE PRESENTACIÓN:

Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid

LUGAR DE INVESTIGACIÓN:

- **Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid.**
- **Instituto de Investigación Sanitaria, Servicio de Cardiología, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid.**

DIRECTOR:

Prof. D. Borja Ibáñez Cabeza

**Director del Departamento de Investigación Clínica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC). Madrid*

**Servicio Cardiología, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz. Madrid*

*“Creo mucho en la suerte y he descubierto que
cuanto más duro trabajo, más suerte tengo”*

Thomas Jefferson

AGRADEDIMIENTOS

Me gustaría aprovechar estas líneas para recordar el momento en el que, siendo un residente prácticamente recién entrado en el hospital, el Dr. Ibáñez se acercó a mí para brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC) y proponerme este proyecto, que tras más de tres años termina viendo la luz. Ha sido un verdadero orgullo poder trabajar contigo todo este tiempo, aprendiendo de tu gran conocimiento de la Medicina en sus distintas vertientes (clínica, académica y por su puesto investigadora), pero también de la propia vida. Borja, siempre estaré agradecido por haber confiado en mí desde el primer día y espero poder seguir trabajando y aprendiendo contigo mucho más tiempo.

Debo acordarme, de todos y cada uno de mis compañeros en el CNIC: investigadores, técnicos de imagen, técnicos de animalario, secretarias... por aportar su granito de arena y hacer que este proyecto saliera adelante. Y no puedo olvidarme de Carlos Galán, la persona sin la que este proyecto no habría sido posible. Gracias Carlos.

En mi etapa de formación como residente en la Fundación Jiménez Díaz, he tenido la suerte de poder trabajar y aprender de dos grandes cardiólogos como son el Dr. Tuñón y el Dr. Farré que me han guiado día a día para conseguir que hoy sea mejor médico. No quiero olvidarme de todos mis compañeros de Servicio tanto residentes como adjuntos que me han apoyado en todos estos años.

No puedo dejar de nombrar y agradecer a mis padres y hermana, su ejemplo vital, inculcándome capacidad de trabajo, espíritu de superación y apoyo incondicional. En especial a ti, mamá, porque sé que esta tesis te hacía casi más ilusión que a mí.

A mi tío Ricardo, ya que él es la persona por la que hoy soy médico, por tus consejos sobre el “oficio” y guiarme en esta difícil profesión.

Y por supuesto a ti, Inés, por aguantarme durante todos estos años, por hacerme crecer y convertirme en alguien mejor, por darme tu visión y apoyo en todas las cosas que nos han ido pasando, pero sobre todo por hacerme tan feliz.

ÍNDICE

RESUMEN.....	11
SUMMARY	15
ABREVIATURAS	19
1- INTRODUCCIÓN	21
1.1 Insuficiencia Cardíaca: conceptos generales	24
1.2 Epidemiología de la Insuficiencia Cardíaca	27
1.3 Miocardiopatía Dilatada.....	29
1.3.1 Miocardiopatía Dilatada isquémica.....	30
1.3.2 Miocardio hibernado	31
1.3.3 Miocardiopatía Dilatada no isquémica.....	34
MCD de causa genética.....	34
MCD de causa adquirida	35
1.4 Tratamiento actual de la miocardiopatía dilatada.	36
1.5 Metabolismo cardíaco	46
RECAPITULACIÓN.....	57
2- HIPÓTESIS.....	59
3- OBJETIVOS	60
4- MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
4.1 Protocolo de estudio.....	62
4.2 Descripción del modelo animal de miocardiopatía dilatada con miocardio hibernado.....	63
4.3 Dieta rica en grasa.....	72
4.4 Declaración ética.....	73
4.5 Análisis estadístico.....	74
5. RESULTADOS	76
5.1 Generación del modelo de MCD con miocardio hibernado.....	76
5.2 Ensayo piloto de dieta grasa en MCD con miocardio hibernado	97
6. DISCUSIÓN.....	101
6.1 Comparación de nuestro modelo con otros modelos animales de IC.	101
6.2 Terapias nutricionales y enfermedad cardiovascular	106
6.3 Metabolismo cardíaco como diana terapéutica.....	109
6.4 Evaluación del metabolismo cardíaco por PET/TAC	111
6.5 Direcciones futuras	113
7. CONCLUSIONES	116
8. BIBLIOGRAFÍA	118
9. ARTÍCULO PUBLICADO COMO RESULTADO DE ESTA TESIS DOCTORAL	

RESUMEN

Introducción

La miocardiopatía dilatada (MCD) es una de las principales causas de insuficiencia cardíaca (IC), siendo la cardiopatía isquémica su causa fundamental. En la actualidad el tratamiento de la MCD está enfocado a limitar la progresión de la misma y evitar la muerte súbita. Es conocido que, en la MCD, así como en otras formas de IC, se produce el llamado “*Switch metabólico*” consistente en un cambio en la fuente principal de sustrato metabólico por parte del corazón. En condiciones fisiológicas, el corazón obtiene energía de diferentes sustratos, siendo el mayoritario los ácidos grasos por su alta rentabilidad energética. En la MCD, la glucosa se convierte en el sustrato preferencial del miocardio. Esta reprogramación metabólica del corazón se ha considerado durante muchos años como una adaptación del corazón a la IC a modo de mecanismo de defensa. Sin embargo, datos recientes de nuestro grupo han demostrado, en un modelo de MCD de ratón, que una dieta con alto porcentaje de grasa puede revertir el *Switch metabólico* del corazón y mejorar la función cardíaca. Estos datos cambian el paradigma establecido hasta entonces ya que la reprogramación metabólica puede ser parte de la fisiopatología de la IC y no un mecanismo adaptativo. Además, estos hallazgos abren la puerta a abordajes terapéuticos nutricionales que puedan revertir este *Switch metabólico* y mejorar la función cardíaca en la MCD. El primer objetivo de esta tesis doctoral fue desarrollar y caracterizar a nivel anatómico, funcional y metabólico un modelo de animal grande de MCD isquémica por miocardio hibernado. El segundo objetivo fue evaluar si una terapia nutricional basada en una dieta rica en grasa podría ser beneficiosa en el modelo de miocardio hibernado. La caracterización del modelo animal en ambos objetivos se realizó con imagen multimodal: angiografía coronaria con

fluoroscopia, Resonancia Magnética cardíaca (RMC) y estudio híbrido de Tomografía por emisión de positrones-tomografía computarizada (PET/TAC).

Material y Métodos

Objetivo 1 (generación de modelo de animal grande de miocardio hibernado):

Un total de 43 cerdos (35 - 45 Kg) de la raza Yucatán minipig fueron sometidos a implante quirúrgico de un ameroide alrededor del segmento proximal de la arteria coronaria descendente anterior (ADA) para inducir una estenosis progresiva hasta su oclusión total o subtotal. El fenotipo de miocardio hibernado se evaluó mediante estudios seriados de angiografía coronaria por fluoroscopia, RMC y PET/TAC tras administración de glucosa radioactiva (^{18}F FDG). El primer estudio de imagen multimodal fue programado 30 días tras la cirugía.

Objetivo 2 (estudio piloto de intervención con dieta grasa para rescatar el fenotipo de miocardio hibernado):

Tras la puesta a punto del modelo, un grupo de animales en el que se había demostrado fenotipo de miocardio hibernado (estenosis coronaria severa en el lugar del implante del ameroide en angiografía coronaria por fluoroscopia, RMC con fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) $<50\%$, con área de realce tardío de gadolinio menor del 50% del espesor miocárdico, y con reserva contráctil bajo infusión de dobutamina y con evidencia de reprogramación metabólica en PET/TAC consistente en hipercaptación de ^{18}F FDG en territorio hibernado) fueron sometidos a dieta grasa (dieta normal enriquecida con 20% de manteca de cerdo) o dieta control durante 2 meses adicionales. El objetivo principal de este estudio piloto fue cambio en la FEVI.

Resultados

Objetivo 1:

El seguimiento medio fue 170 ± 24 días con angiografía coronaria con fluoroscopia, RMC y PET/TAC mensuales. De los 43 cerdos sometidos a cirugía con implante de ateroide, 24 (56 %) murieron antes de ser sometidos al primer estudio de imagen multimodal a los 30 días post-cirugía. 15/43 (35 %) murieron en las primeras 24h (6 durante la cirugía), y 9 fueron encontrados muertos en su habitáculo a la mañana siguiente. 2 de los 28 supervivientes fueron encontrados muertos en su habitáculo entre el día 1 y 7 post-cirugía. 7 de los 26 supervivientes a 1 semana fueron encontrados muertos antes del día 30. Tras el día 30 no hubo muertes en los 19 supervivientes. Por tanto, la mortalidad total fue del 56 %. La estenosis severa de ADA se documentó en todos los supervivientes sometidos a estudio de imagen a 30 días. El 90 % de los supervivientes (17/19) desarrollaron miocardio hibernado con una FEVI (mediana [rango intercuartílico]) de 35 % [32,5 - 40,5 %].

Objetivo 2:

Seis cerdos con fenotipo de miocardio hibernado fueron sometidos a dieta grasa durante 2 meses, y otros 3 cerdos se mantuvieron bajo dieta habitual y sirvieron como controles. La FEVI basal en el grupo de dieta grasa fue de 36,5 % [29,3 - 44,0 %] y en los controles 35,0 % [32,0 - 43,0 %]. Tras 2 meses de dieta grasa, la FEVI mejoró en todos los animales (FEVI en el seguimiento 51,0 % [40,8 - 53,8 %], mientras que en el grupo control no hubo cambios en la FEVI en el seguimiento (33,0 % [31,0 - 42,0 %], $p = 0,0196$). En lo que respecta al PET/TAC, no se objetivó cambios en la captación de ^{18}F FDG ni en el grupo que recibió dieta grasa ni tampoco en el grupo control.

Conclusión

Presentamos un modelo animal grande de MCD isquémica por miocardio hibernado que reproduce las características clínicas de la enfermedad (oclusión de ADA con desarrollo de circulación colateral, disfunción sistólica ventricular izquierda progresiva con viabilidad miocárdica y reprogramación metabólica).

En un estudio piloto, la dieta con alto componente graso se asoció a una mejora consistente y significativa de la FEVI en todos los animales.

Este modelo es de gran valor traslacional para poder testar terapias en un modelo muy similar al humano. La reprogramación metabólica cardíaca aparece como un objetivo terapéutico que puede tratarse con abordajes nutricionales.

SUMMARY

Introduction

Dilated cardiomyopathy (DCM) is one of the main causes of heart failure (HF), with ischemic heart disease being its root cause. Currently, treatment of DCM is focused on limiting the progression of the disease and preventing sudden death. It is known that, in DCM, as well as in other forms of HF, there is a so-called metabolic "switch" consisting of a change in the heart's main source of metabolic substrate. Under physiological conditions, the heart obtains energy from different substrates, the majority of which are fatty acids due to their high energy yield. In DCM, glucose becomes the preferred substrate of the myocardium. This metabolic reprogramming of the heart has been seen for many years as an adaptation of the heart to HF. However, recent data from our group have shown in a mouse model of DCM (Wai et al. Science 2015) that a high-fat diet can reverse the metabolic switch of the heart and improve heart function. These data change the established paradigm since metabolic reprogramming may be part of the physiopathology of HF and not an adaptive mechanism. Furthermore, these findings open the door to nutritional therapeutic approaches that can reverse this metabolic switch and improve heart function in DCM. The first objective of this doctoral thesis was to develop and characterize at an anatomical, functional and metabolic level a large animal model of ischemic DCM by hibernating myocardium). The second objective of this thesis was to evaluate whether a nutritional therapy based on a high-fat diet could be beneficial in the hibernating myocardial model. The characterization of the animal model in both objectives was performed with multimodal imaging: coronary angiography, cardiac magnetic resonance imaging (CMR) and hybrid study of positron emission tomography/computed tomography (PET/CT).

Methods

Objective 1 (generation of large animal model of hibernating myocardium):

A total of 43 pigs (35 - 45 kg) of the Yucatan minipig breed were surgically implanted with an ameroid around the proximal segment of the left anterior descending coronary artery (LAD) to induce progressive stenosis to total or subtotal occlusion. The phenotype of hibernating myocardium was evaluated by serial studies of coronary angiography by fluoroscopy, CMR, and PET/CT scan after administration of radioactive glucose (^{18}F FDG). The first multimodality imaging study was scheduled 30 days after surgery.

Objective 2 (pilot study of intervention with a fat diet to rescue the phenotype of hibernating myocardium):

After completion the model, a group of animals in which hibernating myocardium phenotype (significant stenosis at the site of ameroid implantation in coronary angiography, CMR with left ventricular ejection fraction (LVEF) < 50 %, with late gadolinium enhancement area less than 50 % of myocardial thickness, with contractile reserve under dobutamine infusion and with evidence of metabolic reprogramming in PET/CT consisting of increase uptake of ^{18}F FDG in hibernated territory) were subjected to high fat diet (standard diet enriched with 20 % lard) or control diet for 2 additional months. The main objective of this pilot study was to change the LVEF.

Results

Objective 1:

Mean follow-up was 170 ± 24 days with coronary angiography, CMR and monthly PET/CT. Of the 43 pigs that underwent surgery with an ameroid implant, 24 (56 %) died before undergoing the first multimodality imaging study at 30 days post-surgery. 15/43 (35 %) died in the first 24 hours (6 during surgery), and 9 were found dead in their room

the next morning. 2 of the 28 survivors were found dead in their cage between day 1 and day 7 post-surgery. 7 of the 26 survivors at 1 week were found dead before day 30. After day 30 there were no deaths in the 19 survivors. Therefore, the total mortality was 56 %. Severe LAD stenosis was documented in all survivors undergoing 30-day imaging studies. Ninety percent of the survivors (17/19) developed hibernated myocardium with an LVEF (median [interquartile range]) of 35 % [32.5 - 40.5 %].

Objective 2:

Six pigs with hibernating myocardium phenotype were put on a fat diet for 2 months, and 3 other pigs were kept on a regular diet and served as controls. The basal LVEF in the high fat diet group was 36.5 % [29.3 - 44.0 %] and in the controls 35.0 % [32.0 - 43.0 %]. After 2 months of high fat diet, LVEF improved in all animals (LVEF at follow-up 51.0 % [40.8 - 53.8 %], while in the control group there was no change in LVEF at follow-up (33.0 % [31.0 - 42.0 %], $p = 0.0196$). Regarding PET/CT, no change was observed in the uptake of ^{18}F FDG in either the group receiving the high fat diet or the control group.

Conclusions

We present a large animal model of ischemic DCM by hibernating myocardium that reproduces the clinical features of the disease (LAD occlusion with development of collateral circulation, progressive left ventricular systolic dysfunction with myocardial viability and metabolic reprogramming).

In a pilot study, the high fat diet was associated with a consistent and significant improvement in LVEF in all animals.

This model is of great translational value to test therapies in a model very similar to the human one. Cardiac metabolic reprogramming appears as a therapeutic objective that can be treated with nutritional approaches.

ABREVIATURAS

Acrónimo	Significado
ADA	Arteria Descendente Anterior
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARA-II	Antagonistas del receptor de la Angiotensina II
ARM	Antagonistas del receptor de Mineralocorticoides
BB	Betabloqueantes
CI	Cardiopatía Isquémica
DAI	Desfibrilador Automático Implantable
DSVI	Disfunción Sistólica de Ventrículo Izquierdo
FEVI	Fracción de Eyección de Ventrículo Izquierdo
¹⁸ FDG	18-Fluorodesoxiglucosa
IAM	Infarto Agudo de Miocardio
IECA	Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina
INRA	Inhibidores de la Neprilesina y Receptor de la Angiotensina
IC	Insuficiencia Cardíaca
IC-FEr	Insuficiencia Cardíaca con Fracción de Eyección reducida
IC-FEp	Insuficiencia Cardíaca con Fracción de Eyección preservada
IC-FEm	Insuficiencia Cardíaca con Fracción de Eyección intermedia
MCD	Miocardopatía Dilatada
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
RI	Rango intercuartílico
RMC	Resonancia Magnética cardíaca
TAC	Tomografía Computerizada
TRC	Terapia de Resincronización Cardíaca
VD	Ventrículo Derecho
VI	Ventrículo Izquierdo

1- INTRODUCCIÓN

Es importante comenzar la lectura de esta tesis postulando que a día de hoy la enfermedad cardiovascular constituye la principal causa de muerte en el mundo (1)(2)(3) y es la insuficiencia cardiaca (IC) uno de los síndromes más prevalentes en el espectro de la enfermedad cardiovascular (4)(5). En consecuencia, con este problema de envergadura sanitaria global, la investigación en este campo parece justificada y ciertamente necesaria.

El aumento en los últimos años de la enfermedad cardiovascular se debe a varias causas. En primer lugar, existe un claro envejecimiento de la población de los países desarrollados (6), en segundo lugar debido a la mayor disponibilidad de medios técnicos que permiten el diagnóstico de un mayor número de casos , y en tercer lugar porque los hábitos de vida (alimentación, contaminación, sedentarismo, etc.) favorecen sin lugar a dudas la enfermedad cardiovascular a todos los niveles.

Como se explicará de forma amplia en los capítulos posteriores, la investigación de la enfermedad cardiovascular es un campo relativamente novedoso y, aunque existen herramientas para luchar contra la enfermedad cardiovascular en general y la IC en particular, todavía hay preguntas sin responder.

Es trascendental así mismo, comprender que el manejo de cualquier patología o síndrome es posible gracias a la investigación, ya sea clínica o básica. Detrás de cualquier fármaco, dosis, o técnica diagnóstica, existe un proceso en muchos casos de años, de pruebas, errores y estudio que culmina con lo que al final se ofrece al paciente.

En relación con lo anterior, esta tesis se fundamenta en la necesidad de desarrollar modelos animales lo más parecidos posible al humano donde poder testar las distintas técnicas tanto diagnósticas como terapéuticas.

Este trabajo considera el cerdo un modelo animal con grandes similitudes con el ser humano desde el punto de vista cardiovascular. Así las cosas, es por este motivo que una vez analizado el problema que supone la MCD, decidimos crear un modelo reproducible y único de esta enfermedad donde en primer lugar poder estudiar en profundidad las características de la enfermedad que hoy no se conocen, y por supuesto donde probar distintos tratamientos que pueden ser útiles, entre los que se encuentra la dieta rica en grasa. Aunque la MCD tiene diversas causas, el origen isquémico es el más frecuente. Dentro del espectro de MCD isquémica, es de especial interés aquella donde el miocardio no ha sido dañado de forma irreversible y es por tanto aún viable. En este contexto, existe un gran margen de encontrar terapias capaces de rescatar el miocardio disfuncionante pero viable. La enfermedad coronaria no revascularizable (enfermedad de vaso pequeño, estenosis coronarias crónicas sin posibilidad de abordaje, etc.) es una causa relativamente frecuente de MCD. Por todo ello, en esta tesis decidimos centrarnos este último tipo de MCD, desarrollando un modelo de miocardio hibernado.

El primer objetivo de esta tesis (caracterización de un modelo de animal grande de miocardio hibernado) ya ha sido publicado en forma de artículo científico en una revista de primer cuartil en el campo de las enfermedades cardiovasculares (Basic Res Cardiol), siendo el doctorando el primer firmante del trabajo (7). En las páginas finales del documento se adjunta dicha publicación.

1.1 Insuficiencia Cardíaca: conceptos generales

Se entiende por IC a aquella condición donde en la que el corazón es incapaz de satisfacer las demandas de oxígeno de los diferentes órganos (8), dando lugar a un síndrome clínico caracterizado por la presencia de unos síntomas como disnea y unos signos como la congestión pulmonar (9).

Existen múltiples clasificaciones de IC en función de distintos elementos: IC de predominio derecho vs. izquierdo, IC aguda vs. crónica, IC anterógrada vs. retrógrada o IC sistólica vs. diastólica (10). Aunque clásicamente estas definiciones han sido válidas y utilizadas universalmente, hoy su uso es menor y la tendencia es a utilizar una clasificación más parecida a la última definición aportada (sistólica o diastólica) pero utilizando la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) como criterio único a la hora de diferenciar entre los tipos de IC tal y como reconocen las guías de práctica clínica (9)(11) (Tabla 1).

Tipo de IC	IC-FEr	IC-FEm	IC-FEp
CRITERIOS	Síntomas ± Signos	Síntomas ± Signos	Síntomas ± Signos
	FEVI < 40 %	FEVI 40-49 %	FEVI ≥ 50 %
		<ul style="list-style-type: none">- Péptidos natriuréticos elevados- Al menos un criterio más:<ol style="list-style-type: none">1. Cardiopatía estructural (HVI/DAi).2. Disfunción diastólica	<ul style="list-style-type: none">- Péptidos natriuréticos elevados- Al menos un criterio más:<ol style="list-style-type: none">1. Cardiopatía estructural (HVI/DAi).2. Disfunción diastólica

Tabla 1. Tipos de IC en función de la FEVI. Adaptada de ref (11) (DAi: dilatación de aurícula izquierda; FEVI: fracción de eyección de ventrículo izquierdo; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; IC: insuficiencia cardíaca; IC-FEr: insuficiencia

cardiaca con fracción de eyección reducida; IC-FEm: insuficiencia cardiaca con fracción de eyección intermedia; IC-FEp: insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada).

Como se puede observar en la Tabla 1, la IC se clasifica en tres grupos en función de la FEVI: IC con FEVI conservada ($FEVI \geq 50\%$), IC con FEVI reducida ($FEVI < 40\%$) e IC con FEVI en rango medio ($FEVI 40 - 49\%$). Cada uno de estos 3 grupos se asocia de forma independiente con distintas características demográficas, patología subyacente, tratamiento y pronóstico.

De acuerdo con esta clasificación estandarizada, la MCD es una cardiopatía que englobaría dentro de su amplio espectro a muchas de las IC-FEr, y las IC-FEm pero además de aquellas catalogadas como IC, también son incluidos dentro de este concepto aquellos pacientes asintomáticos con FEVI deprimida, entendiendo como tal una FEVI inferior al 50 %.

Existe una gran cantidad de etiologías que pueden desencadenar la aparición de IC, tal y como se detallan en la tabla 2.

Miocardio enfermo		
Enfermedad cardíaca isquémica	Cicatriz miocárdica	
	Aturdimiento/hibernación miocárdica	
	Enfermedad arterial coronaria epicárdica	
	Microcirculación coronaria anormal	
	Disfunción endotelial	
Daño tóxico	Abuso de sustancias tóxicas de uso recreativo	Alcohol, cocaína, anfetaminas, esteroides anabólicos
	Metales pesados	Cobre, hierro, plomo, cobalto
	Medicación	Fármacos citostáticos (antraciclinas), fármacos inmunomoduladores (anticuerpos monoclonales, interferones, como trastuzumab, cetuximab), antidepresivos, antiarrítmicos, antiinflamatorios no esteroideos, anestésicos)
	Radiación	
Daño inmunomediado e inflamatorio	Relacionado con infección	Bacteriana, por espiroquetas, fúngica, protozoica, parasítica (enfermedad de Chagas), por raquitismo, viral (VIH/sida)
	No relacionado con infección	Miocarditis linfocítica/de células gigantes, enfermedades autoinmunitarias (enfermedad de Graves, artritis reumatoide, trastornos del tejido conectivo, lupus eritematoso sistémico), hipersensibilidad y miocarditis eosinofílica (Churg-Strauss)
Infiltración	Relacionada con enfermedad maligna	Infiltraciones y metástasis directa
	No relacionada con enfermedad maligna	Amiloidosis, sarcoidosis, hemocromatosis (hierro), enfermedad de depósito de glucógeno (enfermedad de Pompe), enfermedades de depósito lisosomal (enfermedad de Fabry)
Alteraciones metabólicas	Hormonales	Enfermedades de tiroides y paratiroides, acromegalia, deficiencia de GH, hipercortisolemia, enfermedad de Conn, enfermedad de Addison, diabetes, síndrome metabólico, feocromocitoma, enfermedades relacionadas con la gestación y el parto
	Nutricionales	Deficiencias en tiaminas, carnitina-L, selenio, hierro, fosfatos, calcio, desnutrición compleja (malignidad, sida, anorexia nerviosa), obesidad
Alteraciones genéticas	Diversas formas	MCH, MCD, VI no compactado, MAVD, miocardiopatía restrictiva (consulte literatura especializada), distrofias musculares y laminopatías
Condiciones de carga anormales		
Hipertensión		
Defectos estructurales de válvula o miocardio	Adquiridos	Valvulopatía mitral, aórtica, tricuspídea, pulmonar
	Congénitos	Comunicación interauricular o interventricular, otros (consulte literatura especializada)
Enfermedades pericárdicas y endomiocárdicas	Pericárdicas	Pericarditis constrictiva Derrame pericárdico
	Endomiocárdicas	SHE, FEM, fibroelastosis endomiocárdica
Estados de gasto elevado		Anemia grave, sepsis, tirotoxicosis, enfermedad de Paget, fístula arteriovenosa, embarazo
Sobrecarga de volumen		Insuficiencia renal, sobrecarga de fluidos iatrogénica
Arritmias		
Taquiarritmias		Arritmias auriculares y ventriculares
Bradiarritmias		Disfunciones del nódulo sinusal, alteraciones de la conducción

FEM: fibrosis endomiocárdica; GH: hormona del crecimiento; MAVD: miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho; MCD: miocardiopatía dilatada; MCH: miocardiopatía hipertrófica; SHE: síndrome hipereosinofílico; VI: ventrículo izquierdo; VIH/sida: virus de la inmunodeficiencia humana/síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Tabla 2. Principales causas de IC. Obtenida de de ref (11).

1.2 Epidemiología de la Insuficiencia Cardíaca

La prevalencia de IC en países desarrollados se sitúa entorno al 2 % (4)(9)(12), lo que representa alrededor de 147 millones de personas (13)(14)(15) en el mundo. Analizando por grupos etarios, vemos que donde es altamente prevalente es en la población mayor de 75 años, en la que la prevalencia alcanza un 8-9 % (4)(15).

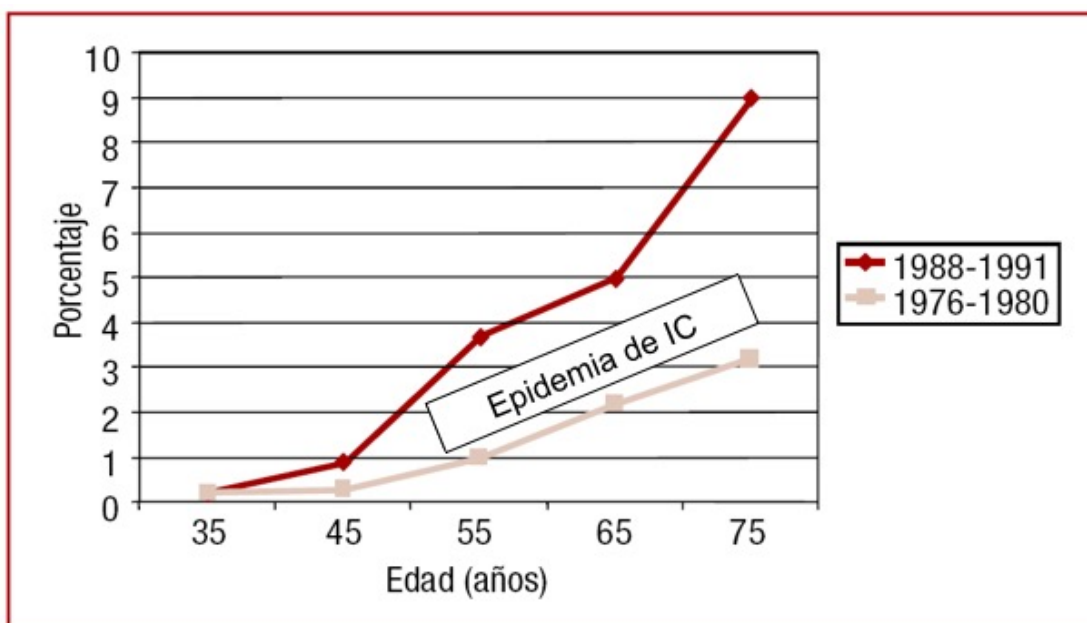


Figura 2. Evolución temporal de la prevalencia de insuficiencia cardíaca en Estados Unidos (datos del estudio NHANES), por grupos de edad. Obtenida de refs (16)(17).

El impacto que tiene la IC sobre la población es importante ya que las tasas de mortalidad a 5 años son incluso superiores a las del cáncer (12)(18). Mientras que en los casos de IC con FEVI deprimida, el desarrollo de nuevos tratamientos ha resultado en una reducción de la mortalidad (15)(19)(20)(21)(22), en la IC con FEVI conservada ésta se ha mantenido invariable.

La prevalencia actual la IC-FEr según el estudio epidemiológico llevado a cabo en Olmstead, Minnesota (EE.UU) (23) entre 2000 y 2010, se encuentra en alrededor de los 100 casos por 100.000 habitantes en las mujeres y sobre 150 casos por 100.000 habitantes en los hombres.

Así mismo, como se puede observar en la figura 3, existe una reducción significativa en la prevalencia de la IC-FEr en los últimos años, que es sin lugar a duda de mayor impacto que la reducción en la prevalencia de la IC-FEp y que es con alta probabilidad el responsable de la reducción la de prevalencia de IC en la población general.

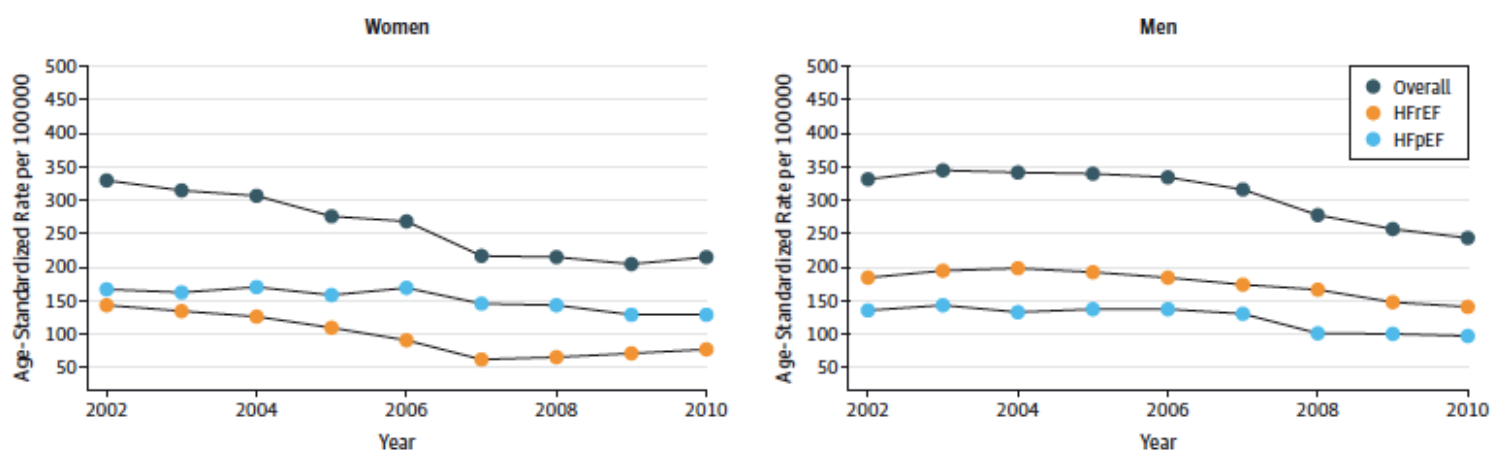


Figura 3. Evolución de la prevalencia de la IC en función del sexo entre 2000 y 2010.
Obtenida de ref (23).

A lo largo de los primeros años del siglo XXI, se publican diversos trabajos donde las tasas de mortalidad en el subgrupo de IC-FEr eran equiparables a las de IC-FEp (18) (25)(26)(27). Hoy se sabe que la FEVI reducida condiciona una mayor mortalidad en

los pacientes con IC mientras que la mortalidad asociada a la FEVI intermedia y preservada es bastante similar (27)(28).

1.3 Miocardiopatía Dilatada

La MCD es una enfermedad del músculo cardíaco de diversa etiología, caracterizada por una dilatación de las cámaras ventriculares cardíacas y una disminución de la función sistólica ventricular izquierda o biventricular, conduciendo a la aparición de IC (8)(29)(30)(31). Si entendemos la MCD como aquella entidad caracterizada por un corazón que presenta aumento de los volúmenes ventriculares y FEVI reducida ($< 50\%$), serían muchas las entidades nosológicas que podrían aparecer como sustrato subyacente. En muchas ocasiones no es sólo una única entidad la responsable en su totalidad de la caída de la FEVI sino una combinación de varias. Con el objetivo de simplificar el estudio de los motivos causales, la MCD se divide en dos grandes grupos: isquémica y no isquémica.

El pronóstico a largo plazo de los pacientes con diagnóstico de MCD es superponible al de la IC en general, con una mortalidad superior al 50-60 % (32) a 10 años sin haber cambiado significativamente en los años previos, lo que significa que sigue siendo una enfermedad de muy mal pronóstico (33)(34).

La MCD se desarrolla como un proceso larvado en el que de forma progresiva se produce una dilatación ventricular, asociado a una pérdida de capacidad contráctil. En paralelo, ocurren cambios estructurales en el músculo cardíaco conocidos como remodelado ventricular (35). Es fundamental determinar y estudiar el remodelado

ventricular ya que es el principal determinante de la progresión de la enfermedad y la diana de la mayor parte de los tratamientos existentes en la actualidad (36)(37).

En la MCD se produce un remodelado ventricular progresivo que hace que la función sistólica sea cada vez más pobre. Se entiende por remodelado ventricular todos aquellos cambios estructurales que ocurren en el cardiomiocito, los fibroblastos, la vasculatura coronaria y la matriz extracelular (36)(37). De todos ellos, juega un papel fundamental la matriz extracelular formada especialmente por colágeno, cuya cantidad y disposición está influida por múltiples elementos: hormonas, factores de crecimiento, citosinas, proteínas reguladoras y factores hemodinámicos, siendo trascendental el equilibrio entre todos ellos para el correcto funcionamiento del músculo cardíaco (38).

1.3.1 Miocardiopatía Dilatada isquémica

La MCD isquémica aparece como consecuencia del desarrollo avanzado de aterosclerosis en las arterias coronarias (39). Se encuadra dentro del gran grupo de la cardiopatía isquémica (CI) que abarcaría a su vez entidades como el infarto agudo de miocardio, la angina estable o la enfermedad coronaria crónica silenciosa. La CI representa en la actualidad la enfermedad cardiovascular más prevalente en el mundo y constituye la principal causa de muerte en mayores de 35 años (40)(41).

Es importante destacar que la CI ha sido en los últimos 50 años la enfermedad cardiovascular más estudiada. Como resultado de esta investigación intensa, desde los años 1970s a esta parte, se ha producido un importante descenso en la mortalidad asociada de ella. Sabemos que el gran desarrollo de las terapias de reperfusión (fibrinólisis, angioplastia primaria, , etc.), la expansión de las unidades coronarias, la aparición de

fármacos como las estatinas o los antiagregantes han cambiado la historia natural de esta enfermedad tremendamente letal hace menos de un siglo (42)(43)(44).

A pesar de los grandes avances en el tratamiento de esta enfermedad, existe un porcentaje significativo de pacientes con CI en sus distintas formas que desarrolla MCD isquémica, bien sea por las consecuencias irreversibles de un evento isquémico agudo sobre el músculo cardíaco (infarto) o bien porque haya una afectación coronaria aterosclerótica tan importante que haga que no sea posible la revascularización (45)(46)(47)(48). Esta última entidad, la enfermedad coronaria no revascularizable, es una forma no infrecuente de MCD isquémica para la que no existe tratamiento. Estos casos abarcan desde enfermedad coronaria con arterias difusamente enfermas no susceptibles de implante de stents o by-pass coronarios, o casos donde las arterias coronarias están totalmente ocluidas, pero se ha desarrollado circulación colateral desde otros territorios que es suficiente para que el miocardio no esté necrosado (mantenga viabilidad) pero el bajo aporte de sangre y nutrientes (hipoperfusión) haga que el músculo cardíaco sea disfuncionante (contractilidad reducida). Esta entidad es conocida como miocardio hibernado, ya que en caso de que se revascularizase, recuperaría su capacidad contráctil y los volúmenes ventriculares (dilatados previamente) regresarían a su normalidad. En casos donde la revascularización no es posible, existe una necesidad imperiosa de encontrar tratamientos que puedan aliviar esta situación.

1.3.2 Miocardio hibernado

Se entiende por miocardio hibernado aquel miocardio que presenta pérdida de su función contráctil manteniendo la viabilidad del territorio afecto. Como se ha dicho

previamente, esta situación aparece como consecuencia de una hipoperfusión miocárdica sostenida como consecuencia la de afectación coronaria aterosclerótica (49)(50).

La hipoperfusión miocárdica mantenida produce una serie de cambios en el metabolismo del cardiomiocito fundamentalmente a nivel mitocondrial, desarrollado en párrafos posteriores (51)(52), así como una activación del sistema nervioso autónomo y del sistema renina angiotensina aldosterona que serán los responsables de la disminución de la capacidad contráctil del miocardio hipoperfundido, pero sin necrosis transmural (48).

En la actualidad, la única estrategia para que el miocardio hibernado recupere la contractilidad es una revascularización coronaria, restableciendo el flujo coronario adecuado en la zona hipoperfundida (53)(54)(55). Sin embargo, como se ha detallado previamente, en muchas ocasiones no es factible una revascularización coronaria y el miocardio hibernado continua disfuncional y dilatado. Debido a los cambios que genera la isquemia crónica en el metabolismo del cardiomiocito, se abre la posibilidad de que una terapia dirigida a este nivel pudiera mejorar o incluso revertir la disfunción miocárdica.

EVALUACIÓN DEL MIOCARDIO HIBERNADO:

Actualmente, existen diferentes abordajes basados en técnicas de imagen para valorar el miocardio hibernado. La técnica inicial es en la mayoría de los casos la ecocardiografía puesto que supone una prueba no invasiva y ampliamente disponible. Esta técnica permite en primer lugar una evaluación de la FEVI, así como de las alteraciones de la

contractilidad segmentaria o la presencia de insuficiencia mitral, que en presencia de DSVI apoyan la etiología isquémica de la misma. A este respecto, se ha establecido que la presencia de un espesor miocárdico en telediástole superior a 8 mm en las regiones hipoquinéticas apoya la viabilidad de ese territorio y por tanto de miocardio hibernado a ese nivel. Por otro lado, si el espesor miocárdico en telediástole es inferior a 6 mm la viabilidad a ese nivel es menos probable (sensibilidad 75%, especificidad 80%) (56)(57).

Otra opción en la evaluación del miocardio hibernado es la ecocardiografía de estrés, en la que se analiza la contractilidad segmentaria en condiciones de estrés (esfuerzo físico/fármacos inotrópicos). Con esta técnica lo que se puede observar inicialmente son alteraciones segmentarias que con bajas cargas de estrés mejoran y que en el pico de estrés empeoran con respecto a la situación basal. Estos hallazgos serían compatibles con viabilidad del territorio con alteraciones segmentarias (sensibilidad 66%, especificidad 88%) (57)(58).

Una tercera técnica en la evaluación del miocardio hibernado es la medicina nuclear (SPECT o el PET/TAC) con la utilización de distintos radiotrazadores. Estas técnicas permiten evaluar las características de las distintas regiones miocárdicas y valorar si una zona con alteraciones segmentarias de la contractilidad en la ecocardiografía presenta características de viabilidad: perfusión conservada, integridad de la membrana celular del cardiomiocito, estado del metabolismo del miocardio a ese nivel y presencia o no de reserva contráctil (58).

Sin lugar a dudas, a día de hoy el patrón oro (*gold standard*) para la evaluación del miocardio hibernado es la RMC (59). La RMC es la técnica más precisa para la

cuantificación de la anatomía, función y composición del corazón. La RMC cuantifica de manera muy precisa los volúmenes y anatomía de las distintas cámaras cardíacas. Así mismo mediante la utilización del gadolinio como contraste se puede identificar la presencia de fibrosis en el músculo cardíaco. Como consecuencia de un evento agudo isquémico (infarto), el músculo cardíaco pierde de manera irreversible unidades contráctiles (cardiomiocitos), que son remplazadas por tejido fibrótico y colágeno. Estos cambios de cardiomiocitos por colágeno resultan en un aumento del volumen extracelular, espacio en el que el gadolinio tarda más en lavarse, siendo visible un realce tardío del mismo, y por tanto de forma indirecta nos permite la evaluación de la fibrosis cardíaca. (60). De acuerdo con lo anterior, en el contexto del miocardio viable pero hipoperfundido, la captación de gadolinio en una región miocárdica es inferior al 50 % del total del espesor del músculo a ese nivel. La especificidad y el valor predictivo positivo de una valoración basada en el 50% de espesor miocárdico con realce tardío de gadolinio es superior al 90 % (61).

1.3.3 Miocardiopatía Dilatada no isquémica

Aparece como la segunda gran entidad dentro del conjunto llamado MCD. Dentro de este grupo se engloban todas aquellas entidades en las que se produce una dilatación del ventrículo izquierdo, unas veces acompañado de una dilatación también del ventrículo derecho y otras no, pero siempre acompañado de una caída de la FEVI por debajo del 50 %. En ellas, no existe una causa isquémica aguda o crónica que lo justifique (8)(29). Es preciso concretar y subdividir dentro de este gran grupo en aquellas que tienen un origen genético y aquellas que por el contrario son adquiridas

MCD de causa genética

También conocida como MCD familiar. Representa el 25-30 % del total de las MCD no isquémicas (29)(62)(63). La prevalencia global en los países desarrollados es alrededor de 36 casos por cada 100.000 habitantes, con una incidencia anual que varía en las diferentes series entre 5-8 casos por cada 100.000 habitantes (64)(65). Es importante mencionar que a día de hoy siendo muy exhaustivos en la evaluación global de los pacientes se identifican mutaciones genéticas específicas en alrededor del 25-30 % de los pacientes (66). El otro 70 % de los casos existe una sospecha clara de que existe una base genética causante de la disfunción cardíaca pero no se consigue identificar una mutación u otra causa que la pueda explicar y se engloba dentro del concepto de MCD idiopática(8). La MCD de causa genética o idiopática se erige como la primera causa de miocardiopatía en los niños menores a 12 años (67)(68) y por otra parte constituye la principal causa de trasplante cardíaco en los países desarrollados (32)(68)(69).

MCD de causa adquirida

Dentro de este grupo podrían encuadrarse entidades muy frecuentes en nuestro medio como puede ser la hipertensión arterial, las valvulopatías y las arritmias cardíacas. Si bien todas estas entidades pueden cursar en algún momento de su evolución del desarrollo de MCD, su sustrato patológico es claramente distinto y el desarrollo de la MCD es una consecuencia de una mala evolución de la enfermedad. Así mismo, también se encuadrarían otras entidades como la MCD enólica, la inducida por quimioterápicos o la miocarditis.

1.4 Tratamiento actual de la miocardiopatía dilatada.

Todos los tratamientos hoy disponibles van dirigidos a ralentizar la progresión de la enfermedad, a prevenir la muerte súbita asociada o a mejorar la calidad de vida de los enfermos. En las siguientes líneas se repasan de forma simplificada los distintos elementos terapéuticos utilizados en la IC-FEr, grupo al que pertenece la MCD. Para simplificar y facilitar la comprensión los dividiremos en: farmacológicos y no farmacológicos. En la figura 4 podemos ver un esquema del manejo global de la IC-FEr según las guías europeas (9)

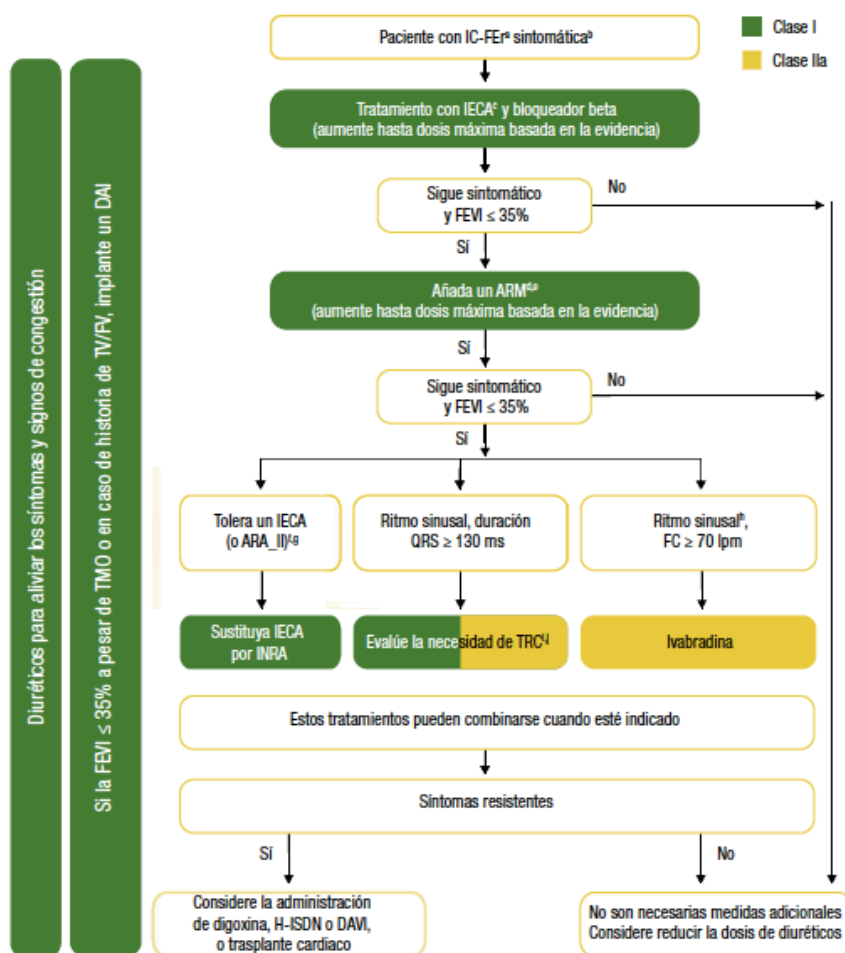


Figura 4. Algoritmo terapéutico del tratamiento de la IC-FEr. En verde los tratamientos con clase de recomendación I y en amarillo IIa. Adaptada de (11).

Tratamiento farmacológico

Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs)/ Antagonistas del receptor de Angiotensina II (ARA-II).

Se trata del grupo farmacológico con mayor evidencia en términos de reducción de morbi-mortalidad en pacientes con IC-FEr. En la IC crónica se produce una activación de fundamentalmente de dos sistemas neurohumorales como son el renina-angiotensina aldosterona y el catecolaminérgico. Este conjunto de fármacos actúa a nivel del primero de ellos y más concretamente inhibiendo el paso de angiotensina I a angiotensina II que es la molécula biológicamente activa (IECAs) o bloqueando su acción a nivel del receptor (ARA-II). Angiotensina II es una molécula que produce vasoconstricción vascular, facilita la persistencia en la circulación de las catecolaminas, reduce la excreción de sodio y agua, estimula la producción de aldosterona y junto con ella actúa a nivel del cardiomiocito facilitando su hipertrofia y posterior sustitución por fibroblastos en lo que se conoce como el remodelado cardíaco (9)(70)(71)(72). Es por todo lo anterior por lo que sus dos principales utilidades son el tratamiento de la tensión arterial y de la IC (9)(73).

En IC-FEr existen más de 30 ensayos clínicos aleatorizados con IECAs y alrededor de 17 con ARA-II que incluyen más de 12000 pacientes demostrando de forma clara el beneficio de estos fármacos en términos de reducción de morbi-mortalidad (74)(75)(76)(77)(78). Si bien es cierto que cuando se comparan ambos grupos

farmacológicos, no se observa ninguna diferencia en términos de mortalidad o reducción de eventos (79).

Betabloqueantes.

Son un grupo de fármacos cuya acción reside en un bloqueo antagónico y competitivo de los receptores beta-adrenérgicos. Sus principales efectos sobre el aparato cardiovascular son la reducción de la frecuencia cardiaca, la ralentización del remodelado negativo y la reducción de la tensión arterial. Los betabloqueantes (BB) fueron descubiertos en los años sesenta como fármacos anti anginosos. Y se consideraron contraindicación absoluta en pacientes con IC durante muchos años por sus propiedades inotrópicas negativas. Una revolución conceptual en el campo supuso el considerar que, contrario a lo pensado hasta el momento, los BB podrían ser paradójicamente beneficiosos. A principios de los años 2000 se demostró que estos fármacos resultaban en un efecto altamente beneficioso en pacientes con IC y, desde entonces, son una piedra angular del tratamiento de la IC en pacientes con disfunción sistólica (80). Sin embargo, la IC debe entenderse en todo su espectro, desde pacientes asintomáticos pero en riesgo de IC (estadio A del *American College of Cardiology/American Heart Association* (ACC/AHA) (70) a pacientes sintomáticos con diferentes rangos de FEVI o incluso pacientes hospitalizados o con síntomas graves de IC.

Los BB han demostrado de manera contundente reducir el riesgo de muerte en pacientes con IC-FEr. Su uso está ampliamente reconocido en las guías recientes de práctica clínica (guías ESC) (9). Los 3 BB con evidencia más robusta en esta población

(el metoprolol, el bisoprolol y el carvedilol) se asocian a una reducción de la progresión de la enfermedad, como lo demuestra la reducción de los tipos de muerte directamente relacionadas (súbita y por IC) y la menor tasa de hospitalizaciones por IC en los diferentes ensayos (81)(153)(154).

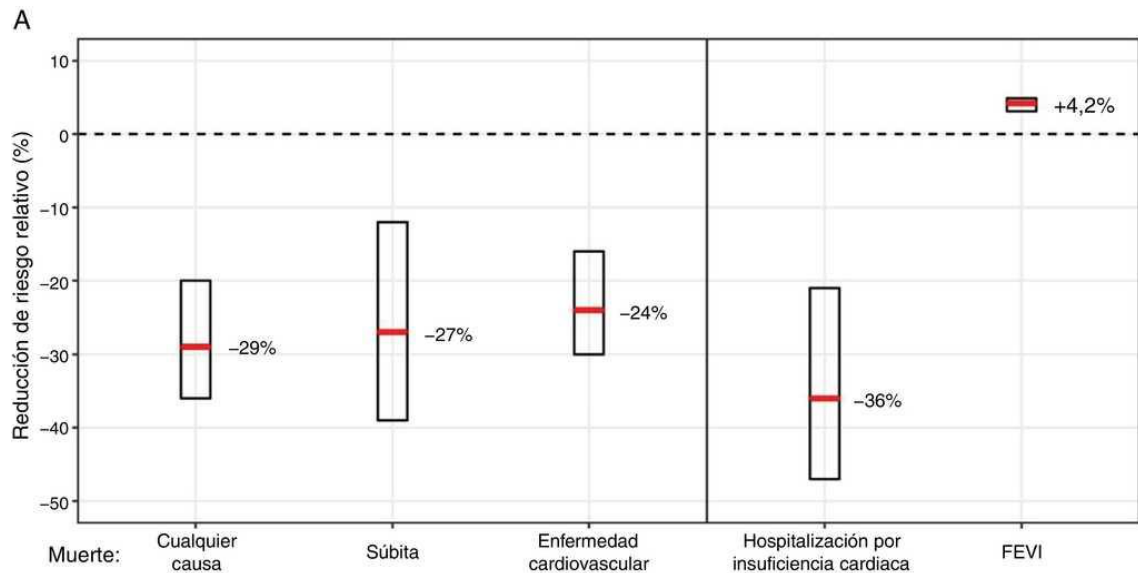


Figura 5. Beneficio de los betabloqueantes en pacientes con insuficiencia cardíaca y fracción de eyección reducida: reducción de riesgo relativo e intervalo de confianza del 95 %. Obtenida de una publicación de nuestro grupo, donde el doctorando es primer autor (80).

Antagonistas de los receptores mineralocorticoide (ARM)

Constituyen el tercer escalón en el tratamiento de la IC-FEr. Fundamentalmente son dos los empleados en la práctica clínica diaria: espironolactona y eplerrenona. De acuerdo a las guías de práctica clínica su uso se debe de considerar en aquellos pacientes

con FEVI < 35 % que continúen sintomáticos a pesar de tratamiento durante 3 meses con BB e IECAs/ARA-II (9).

La aldosterona tiene claras acciones a nivel del músculo cardíaco que participan en el mantenimiento y empeoramiento de la disfunción ventricular izquierda(84). Su activación se produce cuando aparece un daño miocárdico y a nivel del cardiomiocito facilita la hipertrofia de la célula cardíaca, así como induce la sustitución del cardiomiocito por fibroblastos cardíacos sin capacidad contráctil. (85–88). En consecuencia el bloqueo de su acción aparece como una diana en el tratamiento de la IC-FEr como se demuestra en los distintos ensayos clínicos aleatorizados (89)(90)(91).

Inhibidores de la neprilesina y receptor de la angiotensina (INRA)

Es un grupo farmacológico de muy reciente implementación. Es conocido como sacubitril/valsartán, y su mecanismo se basa en el bloqueo simultáneo de la neprilesina y del receptor de la angiotensina (92).

Existen determinados péptidos de producción endógena que tiene efectos potencialmente beneficiosos en la IC, y uno de ellos, quizá el más conocido es el péptido natriurético cerebral o más conocido BNP que tiene efecto natriurético y antifibrótico y por tanto su presencia sería claramente beneficiosa para evitar la progresión de la IC-FEr. Analizando las vías metabólicas de estos péptidos se descubre como existe una enzima llamada neprilesina que entre otras acciones tiene la degradación de estos péptidos pero que su producción se ve estimulada por la angiotensina II (93,94).

En el año 2014 cuando se produce una revolución en el tratamiento de la IC-FEr con la publicación del estudio PARADIGM-HF, que compara el uso de sacubitril/valsartán con enalapril en más de 8000 pacientes con IC-FEr y tratamiento médico óptimo. Este estudio demuestra una reducción de la muerte por cualquier causa, la muerte por causa cardiovascular y los ingresos por IC en los pacientes tratados con sacubitril/valsartán (95). Así, las guías de práctica clínica reconocen este fármaco como el tercer escalón en el tratamiento de la IC-FEr indicando su empleo en aquel paciente que persiste sintomático a pesar de BB, IECAs/ARA-II y ARM (9).

Otros tratamientos farmacológicos

Otros tratamientos médicos que han demostrado tener cierto beneficio en el manejo de la IC-FEr:

- Ivabradina: es un fármaco que reduce la frecuencia cardiaca mediante el bloqueo de los canales I_f del nodo sinusal y que en el estudio SHIFT demostró reducir la mortalidad y los ingresos por IC en pacientes con IC-FEr que pesar de tratamiento con BB, IECAs/ARA-II y ARM estuvieran sintomáticos y con frecuencias cardiacas superiores a 70 latidos por minuto en reposo (96).
- Diuréticos: se han utilizado como tratamiento de IC en general para reducir los signos y síntomas, pero no existen en el momento actual ensayos clínicos aleatorizados que demuestren que su uso reduce morbilidad. Solamente existe un metanálisis donde parece que los

diuréticos de asa reducen el riesgo de muerte y reingresos por IC comparados con placebo (97)

- Digoxina: parece que su utilización podría ser beneficiosa en pacientes en ritmo sinusal en términos de reducción de ingresos por IC, pero en ningún caso reducción de mortalidad, y en lo que respecta a los pacientes con fibrilación auricular es útil en el control de la frecuencia cardiaca pero su utilidad es la reducción de morbilidad asociada es muy controvertido (98)(99).
- Nitratos e hidralazina: solo existe evidencia de beneficio de su uso en pacientes de raza negra que persisten sintomáticos a pesar de IECAs/ARA-II, BB y ARM o como alternativa a los IECAs/ARA-II en pacientes que exista contraindicación para su uso (100)(101)
- Ácidos grasos poliinsaturados n-3: concretamente el eicosapentanoico y docosahexanoico han demostrado en único ensayo clínico aleatorizado su beneficio en la reducción de la combinación de muerte y reingresos por IC (102).

Tratamiento no farmacológico

Desfibrilador automático implantable (DAI)

La disfunción ventricular izquierda, independientemente de cual sea la causa que la origine lleva asociado un incremento del riesgo de muerte súbita derivado debido a presencia de arritmias ventriculares potencialmente fatales (taquicardia ventricular o fibrilación ventricular) (103)(104). Es conocido que el riesgo de presentar una de estas

arritmias está no solo influido por la FEVI, sino que otros factores como la etiología de la disfunción ventricular izquierda, la presencia de mayor o menor fibrosis, los diámetros ventriculares, las valvulopatías asociadas, etc. Así mismo, teniendo en cuenta únicamente la FEVI, la incidencia de arritmias ventriculares aumenta de forma exponencial cuando la FEVI es menor del 40 % (105)(106)(104).

En lo que respecta a la MCD isquémica por miocardio hibernado en particular, se sabe que el riesgo de muerte súbita está aumentado con respecto a la población general ya que la isquemia crónica hace que las regiones miocárdicas subyacentes sean muy inestables y vulnerables desde el punto de vista eléctrico (107). La mejor opción terapéutica en estos casos para la reducción de arritmias ventriculares es obviamente la revascularización y es por esto que no se ha demostrado beneficio del DAI en pacientes con MCD isquémica por miocardio hibernado que son sometidos a revascularización (108). Sin embargo no existe evidencia del papel del DAI en aquellos con enfermedad coronaria no revascularizable, y en consecuencia de acuerdo a las guías de práctica clínica deberían ser encuadrados dentro del grupo de pacientes con IC-FEr de causa isquémica y por tanto el implante de DAI debería estar indicado con FEVI < 35 % a pesar de tratamiento médico óptimo (9) (70).

Terapia de resincronización cardiaca (TRC)

En el momento en que se produce una dilatación y disfunción del ventrículo izquierdo, se produce de forma paralela una afectación del sistema de conducción cardiaco haciendo que la propagación del impulso eléctrico a través del VI sea más lenta

y produce una contracción retardada con respecto al ventrículo derecho en lo que se conoce como asincronía, que favorece la mayor caída de la FEVI, así como la aparición de síntomas de IC clínica. Por tanto la TRC se trata un dispositivo que sincroniza de la manera más fisiológica posible la contracción sistólica de ambos ventrículos disminuyendo el efecto deletéreo de esta asincronía (109,110).

No existe evidencia específica en el campo de la MCD isquémica por miocardio hibernado y las indicaciones de TRC serían las mismas que en el resto de los casos de IC- FEr: máximo nivel de recomendación en pacientes con FEVI < 35 % a pesar de tratamiento médico óptimo y bloqueo de rama izquierda en el ECG, y una recomendación con algo menor de evidencia cuando el QRS es ancho pero no tiene morfología de BRI (9)(70)

Dispositivos de asistencia ventricular y Trasplante cardiaco.

Es el último escalón en el manejo de la insuficiencia cardiaca crónica que es refractaria a todos los tratamientos anteriormente mencionados. El trasplante cardiaco es un tratamiento mundialmente aceptado para el tratamiento de la IC terminal con unas tasas de supervivencia en los últimos años bastante aceptables, pero con el gran problema de que cada vez son menos los donantes. Esto hace que en los últimos años se haya producido un interés científico exponencial en el desarrollo de dispositivos de asistencia ventricular para dar tratamiento a pacientes en situación terminal que bien no llega un corazón compatible o bien presentan ciertos criterios que no les permiten ser candidatos

al mismo. En los próximos años es probable que estos nuevos dispositivos igualen y quizá superen las tasas de supervivencia del trasplante cardiaco.

1.5 Metabolismo cardiaco

De forma simplificada, el metabolismo del miocardio se basa en 3 procesos: el primero, la obtención de energía de los nutrientes disponibles. Segundo, la producción de ATP, la forma bioquímica de transferencia y consumo de energía, proceso que tiene lugar en la mitocondria. Y, finalmente el transporte de ATP a la maquinaria de contracción para que tenga lugar la contracción del músculo cardíaco.

El corazón es el órgano que más energía consume del organismo. El corazón humano adulto en condiciones fisiológicas requiere un suministro diario de ATP en torno a 30 kg, lo que representa aproximadamente 70 veces el peso del órgano (111). La principal fuente de energía del corazón en condiciones fisiológicas son los ácidos grasos, que a través de la beta-oxidación generan aproximadamente el 60 % del ATP total consumido por las células miocárdicas. La segunda fuente de obtención de energía del miocardio son los carbohidratos a través del ciclo de Krebs, quedando otros nutrientes relegados a un aporte menos al 1 % (112).

En condiciones patológicas (IC-FEr, diabetes, obesidad, cardiopatía isquémica, etc.) se produce un cambio en la proporción del uso de sustrato metabólico, ya no siendo los ácidos grasos sino los hidratos de carbonos el principal sustrato energético del corazón en lo que se conoce como *Switch metabólico* (112)(113)(114). En la figura 6 aparecen representadas las principales situaciones que modifican el metabolismo cardiaco.

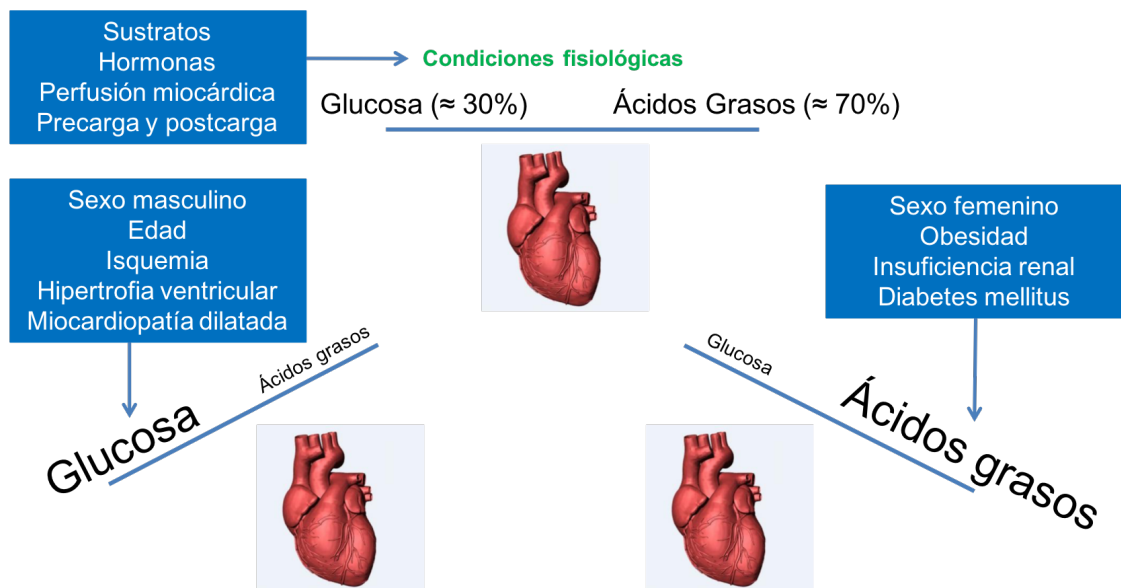


Figura 6. Situaciones que producen alteración en el equilibrio normal del metabolismo cardiaco. Adaptada de (115).

Este *Switch metabólico*, fue considerado inicialmente un mecanismo de defensa ante un insulto al miocardio. De hecho, durante mucho tiempo se ha considerado que ejercía un efecto beneficioso y protector. Los datos más recientes reflejan tanto en modelos animales como en humanos, sugieren que el *Switch metabólico* que ocurre en la MCD podría no ser un mecanismo de defensa, sino un fenómeno deletéreo, ya que el rendimiento energético de la glucosa es 4-5 veces inferior en términos de cantidad de ATP que el de los ácidos grasos. Así por tanto aparece evidencia que sustenta la idea de que la reprogramación metabólica (cambio de consumo preferencial de ácidos grasos a glucosa) es un elemento dañino y perpetuador de la caída de la capacidad contráctil cardiaca (114)(116–118). Esta idea enlaza con lo descrito originalmente por Herrmann y Decherd en 1939, (119) donde comparan por primera vez a la IC con una máquina en la que falta combustible y consecuentemente todos los tratamientos que de forma indirecta

reducen el esfuerzo cardíaco como los BB, IECAS/ARA-II, ARM mejoran el pronóstico de estos pacientes.

Por último, se sabe el alto consumo de energía de tejidos como el músculo cardíaco o el músculo esquelético hace que las mitocondrias sean organelas especialmente relevantes. Existe un concepto clave que es el de dinámica mitocondrial, protagonizado por los procesos fisión (división) y fusión mitocondrial (unión), que es clave en el buen rendimiento energético de la mitocondria (120)(121). Alteraciones en los procesos de fisión-fusión mitocondrial tienen un impacto en la reprogramación metabólica y esto impacta en el proceso de generación de energía, contribuyendo por tanto a estados patológicos, como la IC.

1.5.1 Metabolismo mitocondrial

Las mitocondrias son uno de los orgánulos más importantes del metabolismo celular ya que de ellas, como se ha mencionado, depende la producción de energía. Por otro lado, las mitocondrias están programadas para regular la muerte celular y el envejecimiento (122). Clásicamente, las mitocondrias se definieron como orgánulos independientes que eran muy similares en los diferentes tejidos. Están constituidas por dos membranas: la externa y la interna, siendo esta última donde se ubican las estructuras responsables de los diferentes ciclos metabólicos. La tercera parte es el ADN mitocondrial, que codifica para 13 proteínas (123). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que las mitocondrias son componentes celulares no independientes, sino interconectados y que tienen la misma estructura básica, pero de acuerdo con el tejido

adquirieren diferentes tamaños, conformaciones o ubicaciones celulares para cumplir con las diferentes demandas energéticas de cada tipo celular (120).

Con respecto a la dinámica mitocondrial, abarca 3 grandes procesos. El primero sería el remodelado del retículo mitocondrial mediante procesos de fusión / fisión, entendiendo por fusión la unión de dos mitocondrias y mediante fisión la división de una mitocondria en dos (120). Los eventos coordinados de fusión y fisión son cruciales para el control de calidad mitocondrial y la eficiencia energética. La fusión contribuye al mantenimiento de la masa mitocondrial, mientras que la fisión excesiva causa fragmentación mitocondrial, permitiendo la eliminación de mitocondrias irreversiblemente dañadas mediante la llamada mitofagia y se asocia con la muerte celular, siendo crucial mantener el equilibrio entre estos dos procesos (121). Estos procesos están estrechamente relacionados con el estado metabólico celular y están regulados por un grupo de proteínas hidrolasas de trifosfato de guanosina que pertenecen al grupo de las dinaminasas. Un papel predominante lo tendría OPA1 que es el principal regulador de fusión de membrana interna, de hecho, su procesamiento es el punto clave del equilibrio de fusión / fisión (121)(124,125). Esta proteína presenta distintas conformaciones y en función de la proporción de cada una de ellas se va a ver favorecida la fusión (L-OPA1) o la fisión (S-OPA1) mitocondrial (121)(126,127). En la figura 7 se puede observar de forma esquemática la regulación de los procesos de fusión y fisión mitocondrial.

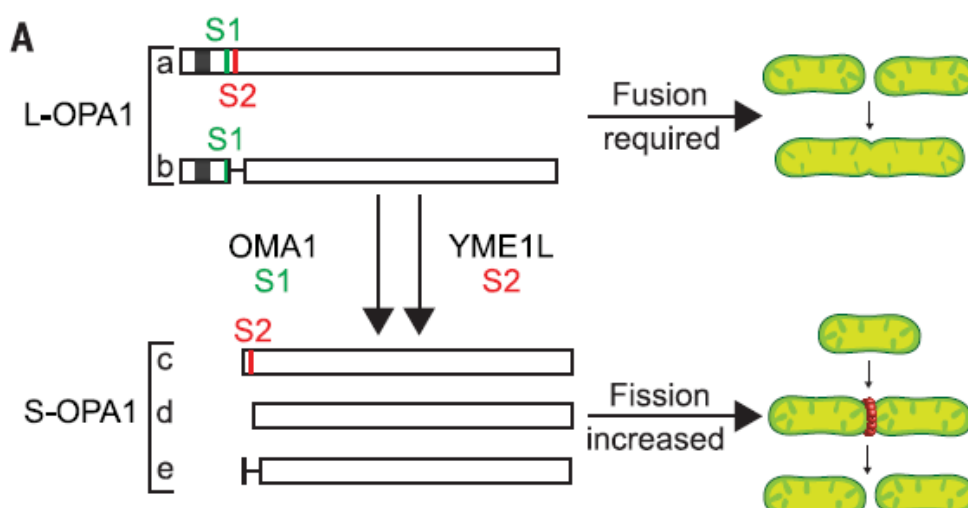


Figura 7. Esquema de la regulación de fusión y fisión mitocondrial. Obtenida de una figura del grupo donde se ha realizado esta tesis (121).

La motilidad mitocondrial subcelular sería el segundo de los procesos, que corresponde al desplazamiento de las mitocondrias dependientes de los motores de kinesis 1 y 3 y los adaptadores Milton y Miro (128), lo que garantiza el suministro local de ATP en procesos biológicos con altos requerimientos de energía y el uso de estos orgánulos como amortiguadores de calcio.

Finalmente, la remodelación de la ultraestructura mitocondrial y la condensación de su matriz, procesos considerados clásicamente como un reflejo del estado metabólico mitocondrial (129).

Disfunción mitocondrial

La alteración de la función y la dinámica mitocondrial se ha asociado con un conjunto de enfermedades de afectación multiorgánica con manifestaciones predominantemente en la infancia y en las que en la mayor parte aparece afectación neurológica y / o neuromuscular. Algunos ejemplos son la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Charcot-Marie-Tooth o el síndrome de Barth. Es cierto que en todas estas entidades se ha descrito una alteración genética que modifica el ADN mitocondrial y que tarde o temprano provoca la disfunción de las células en los diferentes tejidos.

El ADN mitocondrial codifica para 13 proteínas que pertenecen a la cadena transporte de electrones, pero además de estas proteínas dentro de las mitocondrias hay proteínas codificadas por el ADN nuclear responsables de regular y llevar a cabo procesos involucrados en la dinámica mitocondrial.

En concreto, el efecto de la disfunción mitocondrial sobre el corazón genera un amplio rango de patología, que comparten el desenlace común de desarrollo de IC. Una de las posibles causas de afectación cardíaca sería el aumento de la fisión mitocondrial que causaría una alteración del metabolismo normal del cardiomiocito. Al alterar el metabolismo de los cardiomiocitos como principio rector, una intervención que revirtiera el cambio metabólico podría resolver la situación y restaurar la dinámica mitocondrial inicialmente y la función cardíaca a la normalidad.

Así las cosas, nuestro grupo generó un modelo de ratón que era deficiente en una de las proteínas facilitadoras de la fusión mitocondrial descritas en el apartado anterior. Estos animales desarrollaban un fenotipo de MCD y al estudiarlos con PET/TAC se objetivaba un *Switch metabólico* en el que predominaba el consumo de glucosa.

Sorprendentemente, al forzar al miocardio de estos animales a consumir ácidos grasos mediante la administración de una dieta rica en grasa se revertía el fenotipo y recuperaban la función cardíaca así como se reducían los volúmenes ventriculares (121).

Terapia metabólica

De acuerdo con lo previamente desarrollado surgen dos elementos que podrían constituir como un nuevo objetivo terapéutico en pacientes con IC: la alteración de la dinámica mitocondrial y el *Switch metabólico*.

En las diversas entidades que desarrollan insuficiencia cardíaca se incrementan los procesos de fisión mitocondrial y se reducen los de fusión. Este aumento, como hemos visto anteriormente, se debe a la alteración de varias proteínas, por lo que desde el punto de vista de un tratamiento molecular tendría sentido el desarrollo de fármacos capaces de bloquear las proteínas favorecedoras de la fisión mitocondrial o por el lado contrario potenciar la acción de las favorecedoras de la fusión.

El segundo de los objetivos terapéuticos sería la posibilidad de revertir el *Switch metabólico*. No se ha determinado si el *Switch metabólico* es o no una consecuencia de la alteración de la dinámica mitocondrial, pero en cualquier caso guarda relación con ella. Cualquier situación en la que aumente la concentración de ácidos grasos en sangre y, por lo tanto, sea más accesible para las células cardíacas, produce una mejora en la eficiencia energética del miocardio y, en definitiva, una mejora de la función ventricular. El mecanismo por el cual ocurre ha sido demostrado en ratones por nuestro grupo al ver por

PET/TAC que los ratones con MCD que recibieron una mayor cantidad de ácidos grasos en la dieta tuvieron un menor consumo de glucosa por parte del miocardio y una mejora progresiva de la función ventricular manteniendo la estructura de las mitocondrias anormal como se puede ver en la figura 8 (121).

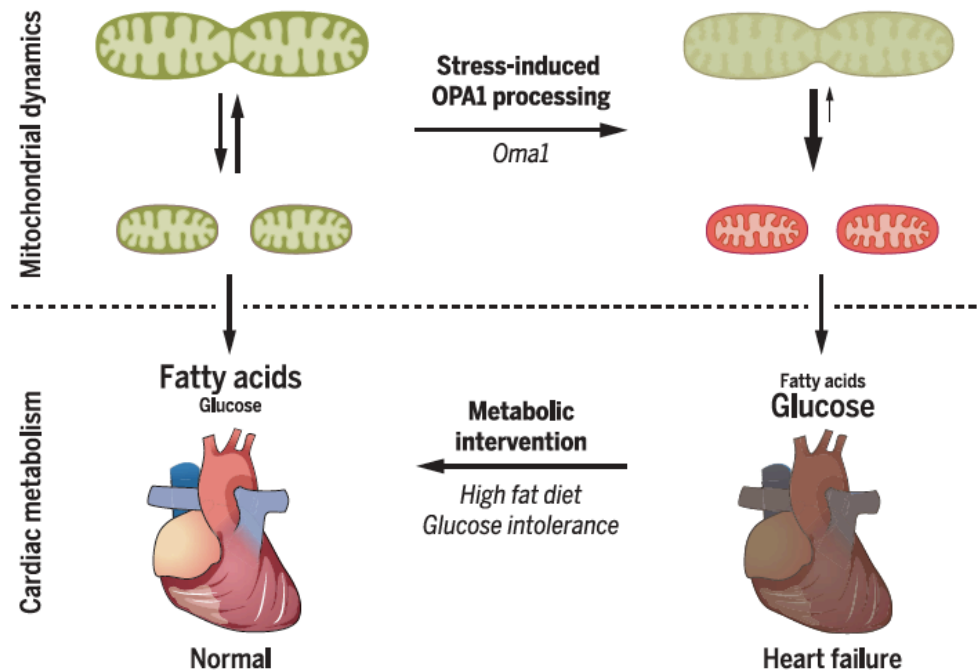


Figura 8. Esquema del resultado de administración de ácidos grasos en la dieta sobre la contractilidad cardíaca en un modelo en ratón de MCD. Obtenida de una publicación de nuestro grupo (121).

Aunque los tratamientos clásicos mediante el bloqueo del sistema adrenérgico, el sistema renina-angiotensina-aldosterona o el uso de dispositivos mejoran la supervivencia de estos pacientes indirectamente, estas posibles intervenciones se abren como un arma potencial que actúa directamente sobre los mecanismos que causan la insuficiencia cardíaca.

1.5.2 Dieta Grasa

Clásicamente una dieta con alto contenido graso se ha relacionado con el desarrollo de aterosclerosis y el aumento del riesgo cardiovascular, es por esto por lo que la mayor parte de las recomendaciones nutricionales de los pacientes con patología cardiovascular van dirigidas a una disminución del consumo de grasas en general.

Sin embargo, estudios recientes sobre el metabolismo cardiaco destacan que claramente son los ácidos grasos los principales suministradores de energía al miocardio. Esto hace surgir una paradoja, ya que por un lado los ácidos grasos contribuyen la aterosclerosis y en definitiva la disfunción cardiaca (infarto, afectación microvascular, síndrome metabólico, etc.) pero por otro lado desde el punto de vista de la eficiencia energética aparecen como el sustrato preferencial, de hecho en el miocardio disfuncionante, el consumo de ácidos grasos se encuentra claramente disminuido en comparación con los corazones de sujetos normales (118)(130). Adicionalmente, la reducción del consumo de ácidos grasos por el cardiomiocito podría ser un predictor para la aparición de una futura DSVI, puesto que se ha relacionado de forma directa la reducción de la beta-oxidación de los ácidos grasos con la gravedad de la afectación cardiaca (131).

Uno de los primeros argumentos que sustentan que una dieta rica en ácidos grasos podría ser beneficioso en términos de eficiencia energética cardiaca, es el hecho de que una depleción aguda de ácidos grasos en una situación de DSVI se asocia a un empeoramiento de la FEVI y un peor rendimiento energético del corazón (117)(132).

Asimismo, una dieta rica en ácidos grasos se asocia a una mejora de la función cardíaca e incluso podría ser un elemento cardioprotector (133).

Son varios los estudios en el campo de la hipertensión arterial y la cardiopatía hipertensiva llevados a cabo en distintos modelos animales, fundamentalmente ratones, que demuestran que una dieta rica en ácidos grasos (incluyendo ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) es capaz de reducir la hipertrofia ventricular izquierda, retrasar la aparición de DSVI o incluso aumentar la supervivencia (133–135)(136).

Así mismo, además del estudio de Wai. T et al (121) ampliamente analizado en epígrafes anteriores, existen estudios en modelos de animal pequeño (ratón) que demuestran que una dieta rica en grasa resulta también en una mejoría de la FEVI y un aumento de la supervivencia en IC tanto isquémica como no isquémica (133)(137–139) (140).

Menos evidencia existe a nivel clínico, donde existen un número de estudios limitado, pero con resultados concordantes con los observados en modelos animales y que dieta rica en grasas podría ser una nueva herramienta en el arsenal terapéutico de la IC. En lo que respecta a la MCD existen dos estudios en humanos donde se observa que el consumo de ácidos grasos poliinsaturados se asocia con una mejoría de la FEVI y que esta mejoría parecer ser dosis-dependiente (133)(141,142)

Incluso existen estudios en humanos que demuestran que el consumo de ácidos grasos poliinsaturados se relaciona de forma inversa en la población con el riesgo de presentar un episodio de IC e incluso con el riesgo de una muerte por IC (102)(143).

De acuerdo lo expuesto previamente, resulta trascendental el desarrollo de modelos animales que traten de reproducir en el animal las características de una determinada enfermedad con el fin de permitir un estudio en profundidad de la misma así como de probar distintas alternativas terapéuticas antes de trasladarlas al humano. En concreto, en la actualidad existen pocos datos procedentes de modelos animales de MCD secundaria a enfermedad coronaria no revascularizable que justifiquen el traslado de distintas terapias del animal al humano. Es por esto que nuestro modelo trata de aportar evidencia con el fin de poder dar un paso a la investigación clínica en este campo.

RECAPITULACIÓN

La IC constituye uno de los grandes síndromes clínicos en el campo de la enfermedad cardiovascular en particular y de la medicina en general, suponiendo un importante consumo de recursos. Dentro de la IC en general, la FEVI nos permite clasificar la insuficiencia cardíaca en dos grandes grupos que a su vez se relacionan con el pronóstico, siendo la IC-FEr la que presenta peor pronóstico.

Son muchas las causas implicadas en el desarrollo de IC-FEr, pero de todas ellas es la cardiopatía isquémica la causa predominante en los países desarrollados, si bien existen causas no isquémicas como las valvulopatías, las cardiopatías congénitas, el consumo de alcohol, etc. que puede favorecer la aparición de MCD.

En el momento actual el arsenal terapéutico existente no va destinado a tratar el sustrato miocárdico que lleva a la pérdida de la capacidad contráctil, sino que su objetivo fundamental reside en la mejora de la sintomatología, evitar la progresión del remodelado ventricular y la prevención de la muerte súbita.

El metabolismo miocárdico aparece como un nuevo agente causal y perpetuador de la MCD, ya que en la IC se produce un cambio del patrón normal de aporte de energía al miocardio pasando la glucosa a ser el fundamental en lugar de los ácidos grasos en lo que se conoce como *Switch metabólico*. Se abre así una potencial diana terapéutica sobre la que una intervención tan simple como cambios en la dieta de los sujetos podría resultar en una recuperación de la función cardíaca.

2- HIPÓTESIS

1. El desarrollo y caracterización de un modelo en animal grande de MCD isquémica con miocardio hibernado es factible y reproduce las características observadas en pacientes. Hipotetizamos que en este modelo, se observará un *Switch metabólico* con cambio de substrato preferencial de ácidos grasos a glucosa en el area miocárdica hipoperfundida disfuncionante.
2. En el modelo de animal grande de MCD isquémica con miocardio hibernado, una dieta grasa tendrá efectos beneficiosos sobre la función cardíaca.

3- OBJETIVOS

1. Desarrollar y caracterizar mediante estudios seriados de imagen multimodal un modelo experimental en animal grande (cerdo) de MCD isquémica con miocardio hibernado que sea reproducible y que recapitule las características que ocurren en los pacientes. Además de los estudios anatómicos y funcionales, es estudiará mediante técnicas de medicina nuclear el uso preferencial de sustrato metabólico en el miocardio de animales con MCD isquémica con miocardio hibernado antes y después de la inducción de enfermedad.
2. Evaluar el papel de una dieta rica en grasa en la función contráctil del miocardio una vez desarrollado el fenotipo de MCD y miocardio hibernado experimental en un estudio piloto.

4- MATERIAL Y MÉTODOS

Como se ha mencionado en los epígrafes anteriores, el presente trabajo tenía un objetivo combinado que consistía en primer lugar en el desarrollo de un modelo viable y reproducible de MCD isquémica con miocardio hibernado (territorio isquémico viable). El desarrollo de este modelo cobra especial importancia ya que permitiría testar terapias que pudieran recuperar la función cardíaca y posteriormente trasladarlas a la clínica. Este modelo debía de reproducir de la forma más fiel posible las características de la MCD isquémica con miocardio hibernado en pacientes (DSVI, ausencia de necrosis transmural y reserva contráctil). Además de lo anterior, debía dar respuesta a la hipótesis de que el miocardio hibernado desarrollaba *Switch metabólico*.

En relación a lo anterior **los resultados derivados del desarrollo del modelo animal de MCD con miocardio hibernado (objetivo 1) han sido recientemente publicados por nuestro grupo en un artículo original, en el que el doctorando es primer autor, y que se adjunta al final de la bibliografía (7).**

Posteriormente, y una vez desarrollado el modelo, el segundo de los objetivos fue testar en un estudio piloto el posible papel terapéutico que una dieta rica en grasa tenía sobre la función sistólica ventricular izquierda, así como sobre el *Switch metabólico*.

4.1 Protocolo de estudio

En la figura 9 se puede ver de forma esquemática el protocolo del **objetivo 1** del estudio (desarrollo y caracterización del modelo de MCD con miocardio hibernado). En los epígrafes posteriores se describen de forma detallada cada una de las fases que conforman el protocolo general.

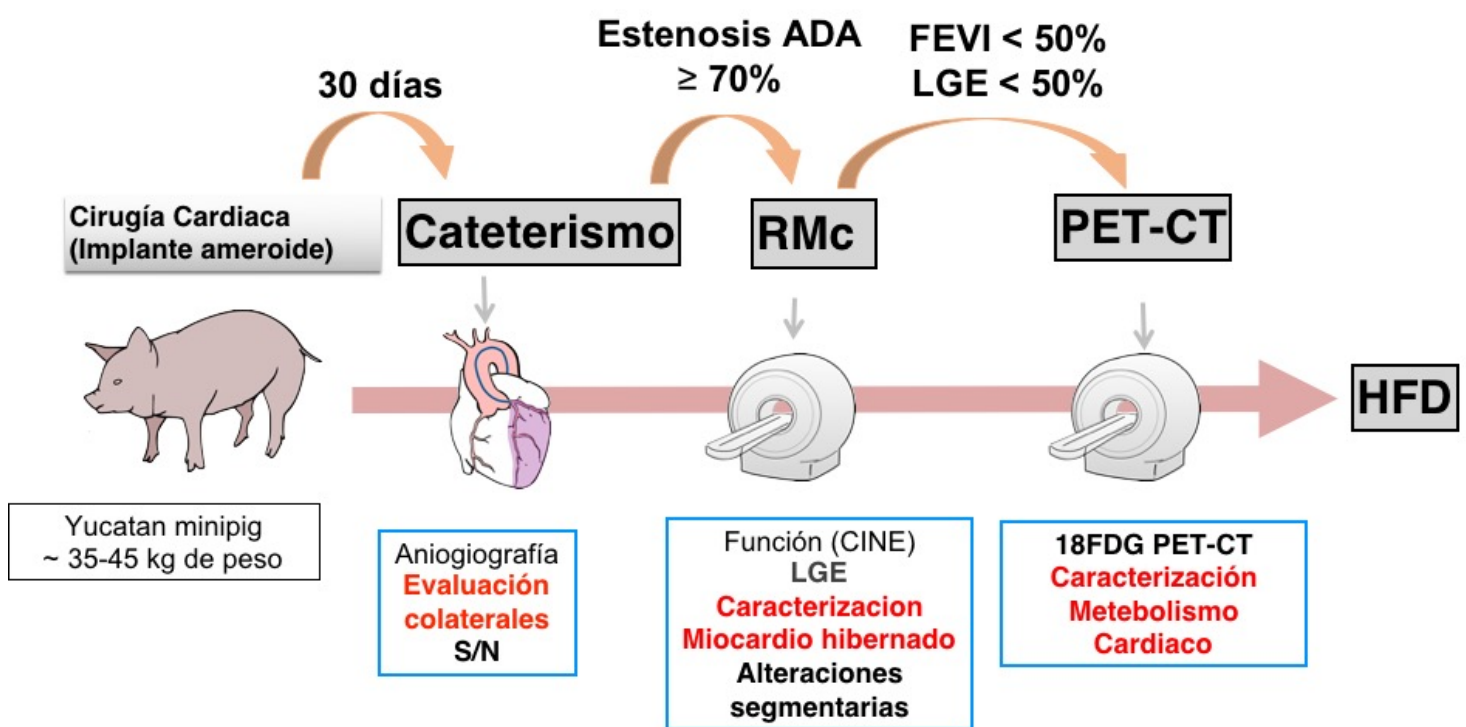


Figura 9. Esquema de trabajo. Se pone de manifiesto el objetivo fundamental de cada una de las pruebas llevadas a cabo. Adaptada de artículo original publicado por nuestro grupo (7).

4.2 Descripción del modelo animal de miocardiopatía dilatada con miocardio hibernado

El animal elegido para llevar a cabo el desarrollo del modelo de MCD fue el cerdo debido a que se trataba de uno de los animales que guardaba más similitudes en la anatomía y fisiología cardíaca con el humano y por tanto consideramos, el más idóneo para llevar a cabo este tipo de experimento. Dentro de los cerdos de experimentación existían distintas alternativas, en nuestro caso fue el Yucatán Minipig el seleccionado (ver figura 10) por la necesidad de realizar estudios de larga duración. Este cerdo no sobrepasa los 80-100 Kg de peso, a diferencia del cerdo común que progresa muy rápidamente a 200 Kg o superior y por tanto es muy complicado para estudios de larga duración.



Figura 10. Foto del Yucatán MiniPig. Obtenida de Sinclair Bioresources.

Protocolo de anestesia

Se sedó a los animales mediante la inyección intramuscular de un cocktail de ketamina (20 mg/kg), xilacina (2 mg/kg) y midazolam (0,5 mg/kg). Una vez premedicados y lavados se llevaron a la sala de preoperatorio donde se intubaron para tener acceso constante a la vía aérea y se canalizó una vía venosa periférica en la vena auricular con un catéter de 18-20G. A partir de este momento el plano anestésico se mantuvo mediante una infusión intravenoso de un cocktail de ketamina, xilacina y midazolam hasta la finalización del experimento.

Cirugía cardiaca de implante de ameroide

La cirugía se llevó a cabo sobre los animales cuando los animales alcanzaban un peso mínimo de 35 kg y no superaban los 45 kg. Los animales fueron trasladados desde la granja al CNIC con una antelación mínima de 48 horas, ya que es sabido que el transporte constituye un importante estrés para los animales y podría desencadenar problemas tras la intervención.

El día de la intervención se procedió a sedar al animal según el procedimiento previamente descrito, y tras esto se trasladó al animal a quirófano y se le colocó en decúbito lateral izquierdo conectándolo al ventilador mecánico (FiO₂ 28 %, PEEP: 5). Los animales estaban en todo momento con sus constantes vitales monitorizadas (ECG de 12 derivaciones, presión arterial sistémica invasiva y pulsioximetría). Se procedía a realizar una mini toracotomía izquierda por tercer o cuarto espacio intercostal, con disección cuidadosa de planos y hemostasia. Una vez dentro de la cavidad pericárdica se localizaba la arteria descendente anterior proximal. Para facilitar la exposición de esta

arteria se daba un punto de tracción sobre la orejuela izquierda con sutura no reabsorbible de prolene 4/0. Posteriormente se realizaba una disección fina y cuidadosa de la arteria descendente anterior y se implantaba el aneroide alrededor del segmento proximal de la misma (ver figura 11). Posteriormente se retiraba la tracción de la orejuela izquierda, se realiza hemostasia y cierre por planos con sutura reabsorbible de vicryl 2/0 para plano muscular y subcutáneo y vicryl 3/0 para piel.



Figura 11. Imagen del aneroide que se implantará sobre la ADA. Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7).

Una vez llevada a cabo la cirugía y comprobado que no había complicaciones en las siguientes 48 horas, el animal volvía a la granja. El animal se iba tratado con doble antiagregación plaquetaria (AAS y clopidogrel) con el fin de evitar una oclusión aguda de la ADA) durante las primeras 4 semanas tras la cirugía, así como con metoprolol oral para tratar de evitar la tasa de arritmias ventriculares.

El objetivo fundamental era que con el paso del tiempo el aneroide captase líquido extracelular paulatinamente haciendo la luz del mismo cada vez más estrecha y

provocando simultáneamente la oclusión coronaria progresiva, lo suficientemente lenta para permitir el desarrollo de la circulación colateral. Después de 4-6 semanas, el ameroide estenosaba de forma significativa ($> 70\%$) la ADA y las colaterales eran suficientes para mantener la viabilidad del miocardio pero no la capacidad contráctil.

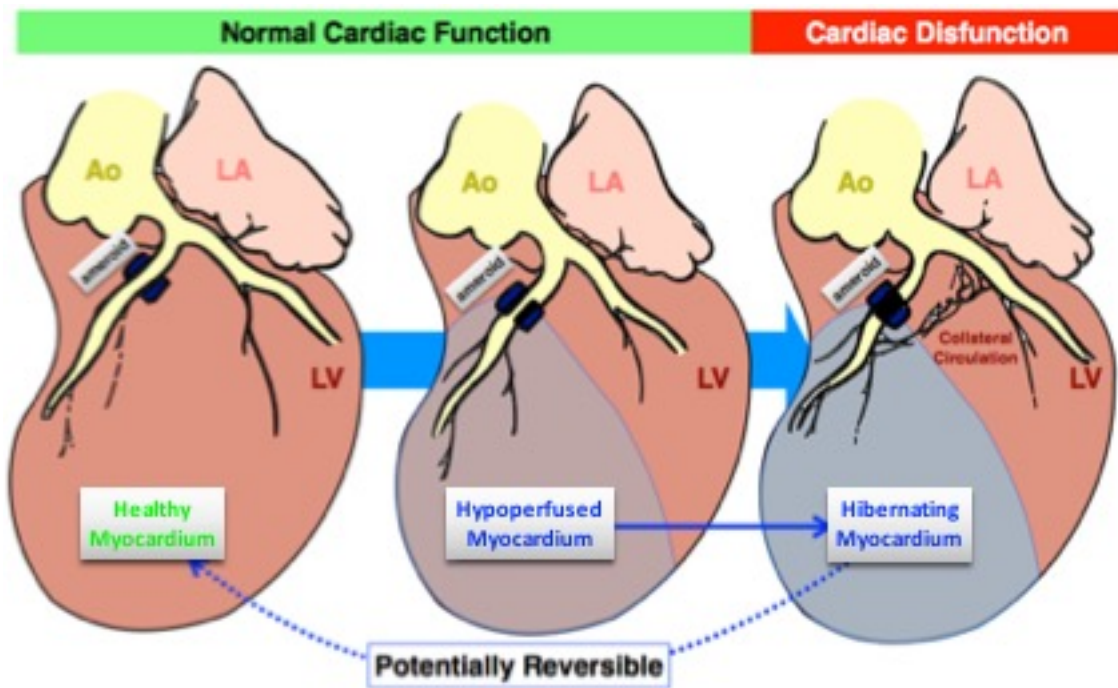


Figura 12. Esquema del efecto esperado del implante del ameroide sobre la ADA.

Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7).

Angiografía Coronaria por fluoroscopia.

Se realizó una angiografía coronaria invasiva de seguimiento para evaluar el grado de estenosis luminal del ADA inducida por la hidratación progresiva del ameroide, así como la presencia de circulación colateral. Se sedó a los animales como se ha descrito

anteriormente, y se les aplicó una inyección intramuscular de buprenorfina (0,01 mg/kg) para la analgesia. A través de un acceso percutáneo a la arteria femoral, las arterias coronarias izquierdas y derechas se sondaban mediante catéteres diagnósticos. Se inyectaría un contraste de yodo y se registraron varias proyecciones de fluoroscopia para cada arteria coronaria. Se repetiría la prueba cada dos semanas hasta documentar una estenosis $> 70\%$ de la ADA.

Resonancia magnética cardíaca (RMC)

Se realizó el examen basal (aproximadamente semana 8 tras cirugía) un vez que en el cateterismo se demuestra una estenosis $> 70\%$ de la ADA con el fin de ver disminución de la FEVI por debajo del 50% y una LGE inferior al 50% del espesor de la pared miocárdica, lo cual indica viabilidad de la misma. En caso de no presentar FEVI $< 50\%$ la RMC se repetiría cada 10-15 días hasta demostrar FEVI $< 50\%$ y LGE $< 50\%$. Como criterio para ser excluido del estudio se consideró un LGE $> 50\%$. Una vez demostrado se llevaría a cabo el PET/TAC con ^{18}F FDG con el fin de demostrar *Switch metabólico*. Si a las 16 semanas post-cirugía no presentaba estenosis $> 70\%$ de la ADA o la FEVI persistía $> 50\%$, el animal saldría del protocolo.

En algunos animales seleccionados se realizaría una RMC de estrés con dobutamina con el fin de evidencia la viabilidad de la zona isquémica.

Todos los estudios se realizaron con un escáner de cuerpo entero Philips 3-T Achieva Tx (Philips Healthcare, Best, Holanda) equipado con una bobina cardíaca de 32

elementos en serie. El protocolo RMC incluye una secuencia estándar segmentada de cine en estado estable de libre precesión (SSFP) para proporcionar referencias anatómicas de alta calidad, y secuencias LGE ponderadas T1.

Los parámetros de imagen de la secuencia cine SSFP son los siguientes: campo de visión (FOV) de 280 x 280 mm, grosor del corte 6 mm sin huecos, tiempo de repetición (TR) 2,8 ms, tiempo de eco (TE) 1,4 ms, ángulo de giro 45°, fases cardíacas = 30, tamaño del vóxel 1,8 x 1,8 mm, y número de excitaciones (NEX) = 3.

Las imágenes LGE se realizaron 10-15 min después de la administración intravenosa de un agente de contraste de gadopentetato de dimeglumina de 0,2 mM/kg utilizando una secuencia de eco de campo turbo estropeado de inversión-recuperación 3D (TR/TE/ángulo de giro = 2,4ms/1,13ms/100°) con una resolución isotrópica de 1,5x1,5x1,5 mm³ en un FOV de 340x340x320 mm³ en las direcciones FH, LR y AP. Los datos fueron adquiridos en la diástole media con una ventana de adquisición de 151,2 ms. La adquisición se aceleraba utilizando un factor de SENSE neto de 2,25 (1,5 x 1,5 en las direcciones AP y LR) con un ancho de banda de 853Hz por píxel. El tiempo de inversión se ajustó antes de la adquisición utilizando una secuencia de exploración de look-locker con diferentes tiempos de inversión para asegurar la anulación adecuada de la señal de miocardio sano. Para el análisis, el volumen 3D fue reconstruido en vista de eje corto con un espesor de corte de 6mm. La perfusión cuantitativa cardíaca se estimó utilizando la adquisición dinámica con la técnica de recuperación de saturación dual (TS = 20, 80 ms) durante la administración de contraste basado en gadolinio (0,2 mmol) como se describió anteriormente (144)

Los estudios de RMC fueron analizados por 2 observadores experimentados e independientes usando un software dedicado (IntelliSpace Portal, Philips Healthcare, Best, Holanda). Brevemente, se trazaron los bordes cardíacos del VI en cada imagen de cine para obtener la masa diastólica final del VI, el volumen diastólico final del VI, el volumen sistólico final y la FEVI. También se obtuvieron los valores de engrosamiento de la pared para la evaluación de la contractilidad anterior y posterior a partir del trazado de los bordes cardíacos. Las regiones tardías mejoradas con gadolinio se definieron como porcentaje de la intensidad máxima de la señal miocárdica (ancho total a la mitad del máximo) y se analizaron cuantitativamente. Después de la generación del mapa de perfusión, se analizaron las regiones de interés en las áreas anteriores y posteriores utilizando un software dedicado (MR Extended Work Space 2.6, Philips Healthcare).

PET/TAC con ^{18}FDG

Se realizó el examen basal (aproximadamente semana 8 tras cirugía) una vez que en el cateterismo se demostró una estenosis $>70\%$ de la ADA y la FEVI estaba por debajo del 50% con LGE $< 50\%$. Se buscaba demostrar *Switch metabólico* demostrado como un aumento de la captación de ^{18}FDG en el territorio isquémico. Una vez demostrado el *Switch metabólico* se aleatorizaba al animal a recibir dieta grasa o control durante 2 meses. Se repitió junto con la RMC final de seguimiento. Se realizaron algunos animales sanos control para poder comparar.

Todos los estudios se realizaron con el escáner GEMINI TF de 64 cortes PET/TAC (Philips Healthcare, Best, Holanda). Los animales estaban en ayunas 24 horas

antes de los exámenes, teniendo libre acceso al consumo de agua, con el objetivo de que el nivel de glucosa se normalizase a 100-150 mg/dL. Se extrajeron gotas de sangre, y la glucosa se cuantificó usando un sistema de monitoreo de glucosa en sangre CONTOUR™ PLUS. Si los niveles de glucosa eran <100 mg/dL, se administraba un bolo intravenoso de solución salina con 50 % de glucosa (bolo de 5 mL por 10 mg/dL) por debajo de 100 mg/dL (por ejemplo, 5 mL cuando la glucosa era 90-99mg/dL, 10 mL cuando la glucosa era 80-89, etc.). Cuando los niveles de glucosa eran >150 mg/dL, se hacían extracciones repetidas de sangre cada 15 minutos mientras el cerdo descansa hasta que los niveles estén en el rango objetivo. La concentración de glucosa debía permanecer en el rango objetivo durante al menos 30 min. antes de la inyección de radiosonda. Los estudios de PET/TAC se adquirieron 40 minutos después de la administración i.v. de 370 MBq de 18F-FDG. Los datos del PET/TAC se recogieron durante 45-60 minutos con los animales anestesiados como se ha descrito anteriormente y se reconstruían. Después del PET/TAC, se adquirió un TC cardíaco con contraste de yodo, mejorado con ECG usando un kVp de rayos X, y se reconstruyó para superponer las estructuras anatómicas a la distribución de 18F-FDG. Los estudios de PET/TAC fueron analizados utilizando un software dedicado (IntelliSpace Portal, Philips Healthcare, Best, Holanda) colocando un ROI en el área anterior y en las regiones posteriores. Los valores fueron cuentas normalizados al pool de sangre (ROI colocado en la aorta torácica descendente).



Histología.

Se realizó la eutanasia a los animales mediante una inyección intravenosa de pentobarbital en sobredosis (50 mg/kg por vía intravenosa). Después de la extracción del corazón, se recogieron muestras del ventrículo izquierdo (antero-septal y paredes laterales

libres) para su histología. Las muestras se fijaban en formalina al 4 % y luego se transferían a etanol al 70 %. Tras la inclusión en parafina, se cortaron en secciones de 4 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

4.3 Dieta rica en grasa.

En la actualidad no existe una dieta estandarizada que podamos considerar como dieta rica en ácidos grasos para animal grande. En este estudio se ha considerado que el grupo de animales que recibieran dieta grasa, esta dieta sería una dieta estándar sobre la que se añadiría un extra de un 20 % de manteca. Así en la *figura 14*. se puede ver la composición de la dieta normal de los animales a estudio.



Nº Lote: 1606090999999

NANTAREP

Pienso completo

Cerdas vacías, gestantes y verracos

COMPONENTES ANALÍTICOS

Proteína bruta: 12.5%, Aceites y grasas brutos: 3.4%, Fibra bruta: 6.5%, Ceniza bruta: 5.3%, Calcio: 0.90%, Fósforo: 0.54%, Sodio: 0.20%, Metionina: 0.19%, Lisina: 0.59%

COMPOSICIÓN

Cebada, Salvado de trigo, Harinillas de maíz², Salvado de arroz, Harina de extracción de semilla de girasol, Carbonato de calcio, Paja de cebada, Cloruro de sodio, Fosfato monocálcico,
(2) Producidos a partir de maíz genéticamente modificado.

ADITIVOS

VITAMINAS: 3a672a Vitamina A 6400 UI/kg, E671 Vitamina D3 1200 UI/kg, (prohibida la administración simultánea con vitamina D2), 3a700 Vitamina E 40 mg/kg, 3a890 Cloruro de colina 573 mg/kg, (evitar el uso simultáneo con cloruro de colina en agua de bebida), OLIGOELEMENTOS: E1 Hierro – Fe (carbonato ferroso) 64 mg/kg, E5 Manganeseo – Mn (Óxido manganoso) 24 mg/kg, E6 Zinc - Zn (Óxido de Zinc) 80 mg/kg, E8 Selenio - Se (Selenito de sodio) 0.12 mg/kg, E2 Yodo – I (Ioduro de potasio) 0.4 mg/kg, E4 Cobre – Cu (Sulfato cúprico pentahidratado) 8 mg/kg, DIGESTIVOS: 4a1640 6-ftasa EC 3.1.3.26 600 FTU/kg, LIGANTES: E562 Sepiolita 270 mg/kg,

MODO DE EMPLEO

Suministrar desde destete hasta entrada en maternidad 2,0 a 3,5 kg según PV, condiciones ambientales y momento de gestación. Conservar en lugar fresco y seco.

Figura 13. Composición de la dieta que reciben los animales sobre la que se añade un 20 % extra de materia grasa.

4.4 Declaración ética

El protocolo de investigación se ajustó a la normativa establecida en el Acuerdo de Transparencia en Experimentación Animal promovido por la Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE), con la colaboración de la Asociación Europea para la Investigación Animal (EARA). Además de lo anterior el estudio ha recibido la aprobación del Comité Ético del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

4.5 Análisis estadístico

Los datos se consideraron variables continuas y los resultados se presentaron como mediana y rango intercuartílico o bien como media y desviación estándar. La evolución de la FEVI se representó en un gráfico tipo *box plot*. Además las gráficas *box plot* se utilizaron para representar la extensión del LGE en porcentaje, la contractilidad regional, la perfusión cuantitativa y los recuentos de ^{18}F -FDG con la mediana como valor central y el rango intercuartílico como límites. Por otra parte, mediante una gráfica tipo Kaplan-Meier se expresó la supervivencia de los animales en el estudio.

Con respecto a la segunda parte del estudio, se trataba de un estudio mixto pseudoexperimental de cohorte y controles donde se intentó ver el efecto de una dieta grasa sobre la FEVI en animales con MCD. Se expusieron los datos pormenorizados correspondientes a los parámetros analizados en cada uno de los animales, expresándose los resultados con mediana y rango intercuartílico. También se hizo una comparación de los incrementos de las FEVI del grupo de intervención y el grupo control, basal y tras 2 meses de recibir dieta grasa o dieta estándar. Estos análisis se realizaron con STATA 14.2 “Statu Corp.” Texas. USA y “3.0.1 (www.r-project.org)], aplicando la prueba de U de Mann-Whitney y se consideraron significativos cuando el valor de la “p” fue inferior a 0,05. Algunas de las gráficas fueron realizadas con el software Restudio, utilizando el paquete gráfico ggplot2.

5. RESULTADOS

5.1 Generación del modelo de MCD con miocardio hibernado

Es importante mencionar en este punto que la puesta a punto del modelo pensado sobre el papel no fue fácil y necesitó de varios meses hasta conseguir depurar cada uno de los puntos de los que consta el protocolo. Para ello, se llevaron a cabo un número considerable de estudios, muchos de ellos fallidos en los que se ajustaron los pequeños detalles para poder hacer que el modelo fuera lo más reproducible y viable posible. Cómo es predecible uno de los puntos de mayor dificultad fue el implante quirúrgico del ameroide alrededor del segmento proximal de ADA. En la figura 14 se puede observar una imagen del resultado final del implante del aneroide.

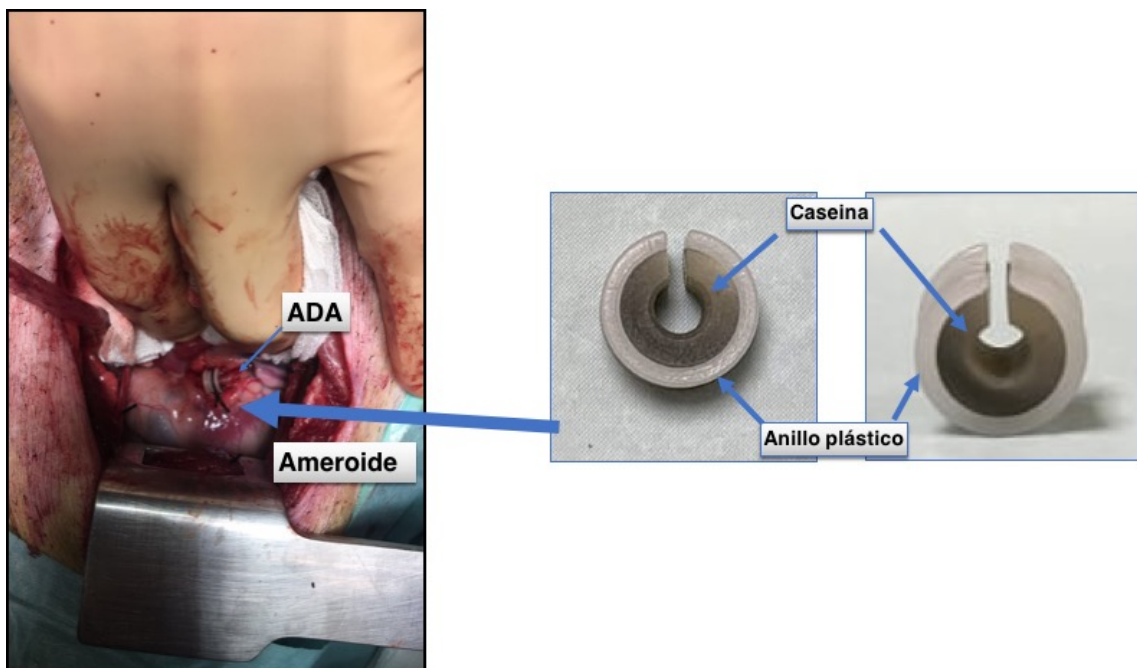


Figura 14. Imagen del implante del ameroide sobre el segmento proximal de ADA. Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7).

Seguimiento

Entre noviembre de 2016 y enero de 2019 se operaron 43 Yucatán Minipigs con pesos comprendidos entre los 35-45 kg. En la Tabla 3 se pueden observar de forma pormenorizada las características de cada uno de los animales intervenidos, incluyendo los pesos, si completaron o no el estudio, el tiempo transcurrido desde la cirugía hasta su muerte.

Del total de 43 animales intervenidos, 24 animales fallecieron antes del día 45. Esto representa una mortalidad del 56 % (figura 15).

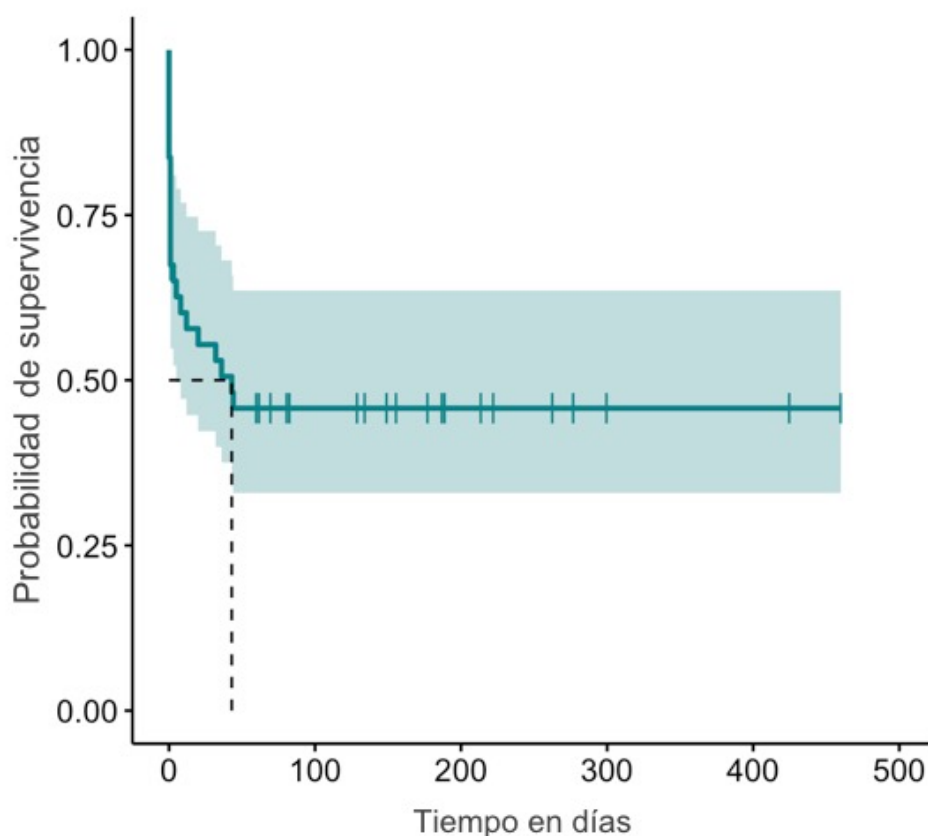


Figura 15. Curva de Kaplan-Meier representando la mortalidad global del estudio.

Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7)

Dentro de los animales que murieron antes de poder ser estudiados, podemos dividir la mortalidad en tres momentos:

- Peri-cirugía (en la cirugía o en las primeras 24 horas tras la cirugía): 15 animales, lo que representaba el 62,5 % del total de los animales muertos sin ser estudiados. Esta mortalidad se atribuyó a complicaciones quirúrgicas. En concreto en 6/15 se documentó fibrilación ventricular o rotura coronaria. Los 9 animales restantes fueron encontrados muertos en su jaula.
- Post-cirugía temprano (día 2 - día 7): 2 animales es decir un 8,33 % del total. Ambos fueron encontrados muertos en su jaula.
- Tardío (día 7 - día 45): 7 animales, un 29,16 % de todos los animales muertos. Todos ellos fueron encontrados sin vida en sus jaulas.

De los animales que sobrevivieron más allá del primer estudio de imagen de seguimiento a 30 días, no se documentó ningún fallecimiento.

Cotral	Peso (Kg)	Días Cirugía-Muerte
MH1	42,5	-
MH2	46	0
MH3	53	5
MH4	41	0
MH5	41	1
MH6	33	-
MH7	39	1
MH8	48,5	-

Crotal	Peso (Kg)	Días Cirugía-Muerte
MH9	46	-
MH10	48	-
MH11	44,5	-
MH12	39	0
MH13	41	-
MH14	41	-
MH15	42	-
MH16	47,5	3
MH17	42,5	-
MH18	42	-
MH19	40	-
MH20	40,5	0
MH21	38	1
MH22	31	0
MH23	46	1
MH24	47	-
MH25	44	-
MH26	43	-
MH27	42,5	8
MH28	44,5	1
MH29	49	1
MH30	52	1
MH31	40	12
MH32	41,5	-
MH33	44,5	0
MH34	44	36
MH35	39	-
MH36	37,5	-

Crotal	Peso (Kg)	Días Cirugía-Muerte
MH37	35,5	44
MH38	38	17
MH39	36	32
MH40	44	1
MH41	43,5	0
MH42	44	43
MH43	41	-

Tabla 3. Listado de los animales intervenidos.

Desarrollo de MCD

De los 19 animales que sobrevivieron más allá de los 45 días tras la cirugía, solo 2 animales (10,5 %) no desarrollaron DSVI y/o viabilidad en la región anterior. De estos dos animales, en uno de ellos no se documentó en ningún momento ni una mínima estenosis de la ADA y en consecuencia la FEVI en repetidas RMC era totalmente normal sin aparición de alteraciones de la contractilidad segmentaria, así el animal terminó siendo sacrificado tras 4 coronariografías y 4 RMC. En el otro caso, por el contrario, había una oclusión total de ADA, pero en el momento en que se realizó la RMC además de apreciarse una DSVI muy severa con aquinesia de toda la cara anterior, en el estudio de viabilidad con gadolinio se comprueba que la LGE era prácticamente del 100 % correspondiente a necrosis transmural y en consecuencia fue sacado del protocolo y sacrificado (figura 16). Por el contrario no hubo ningún animal que no desarrollase oclusión/suboclusión de la ADA y desarrollase DSVI.

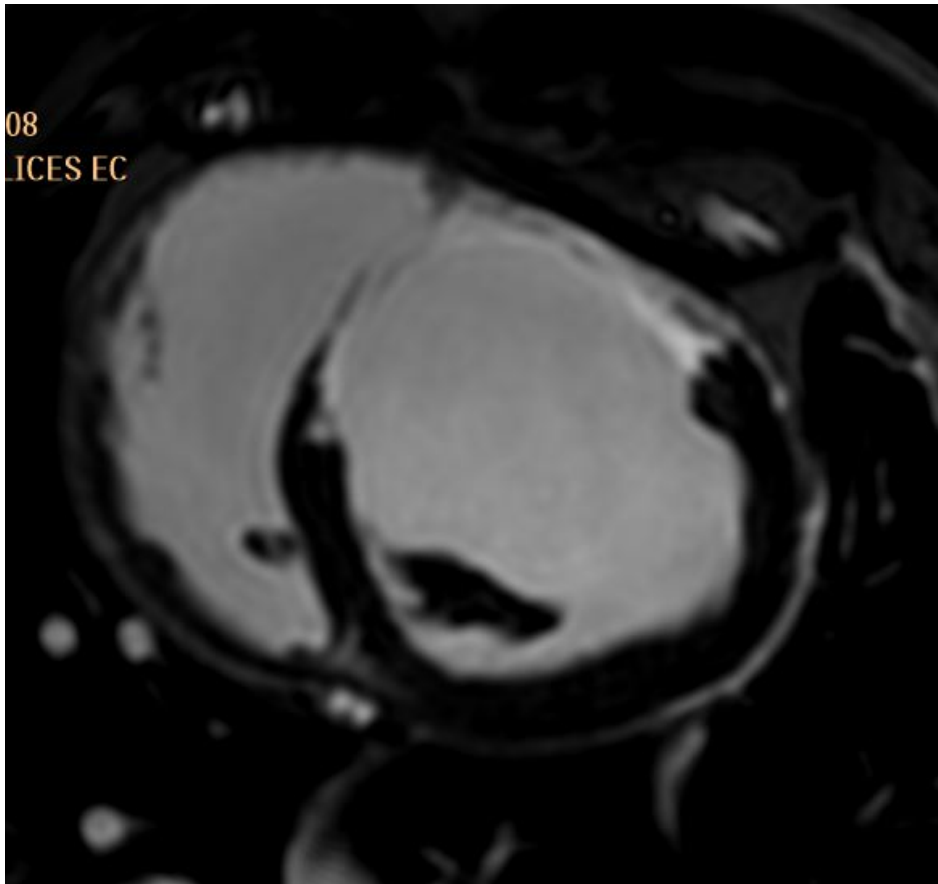


Figura 16. Imagen de RMC del animal que salió de protocolo por presentar necrosis transmural (LGE > 50 %).

En los 17 animales restantes (89 %), se observó en todos estenosis significativa de la ADA (un ejemplo se puede observar en la figura 17). En la mayor parte de los animales observa circulación colateral homocoronaria (figura 17) y, en menor medida, circulación colateral heterocoronaria (figura 18)

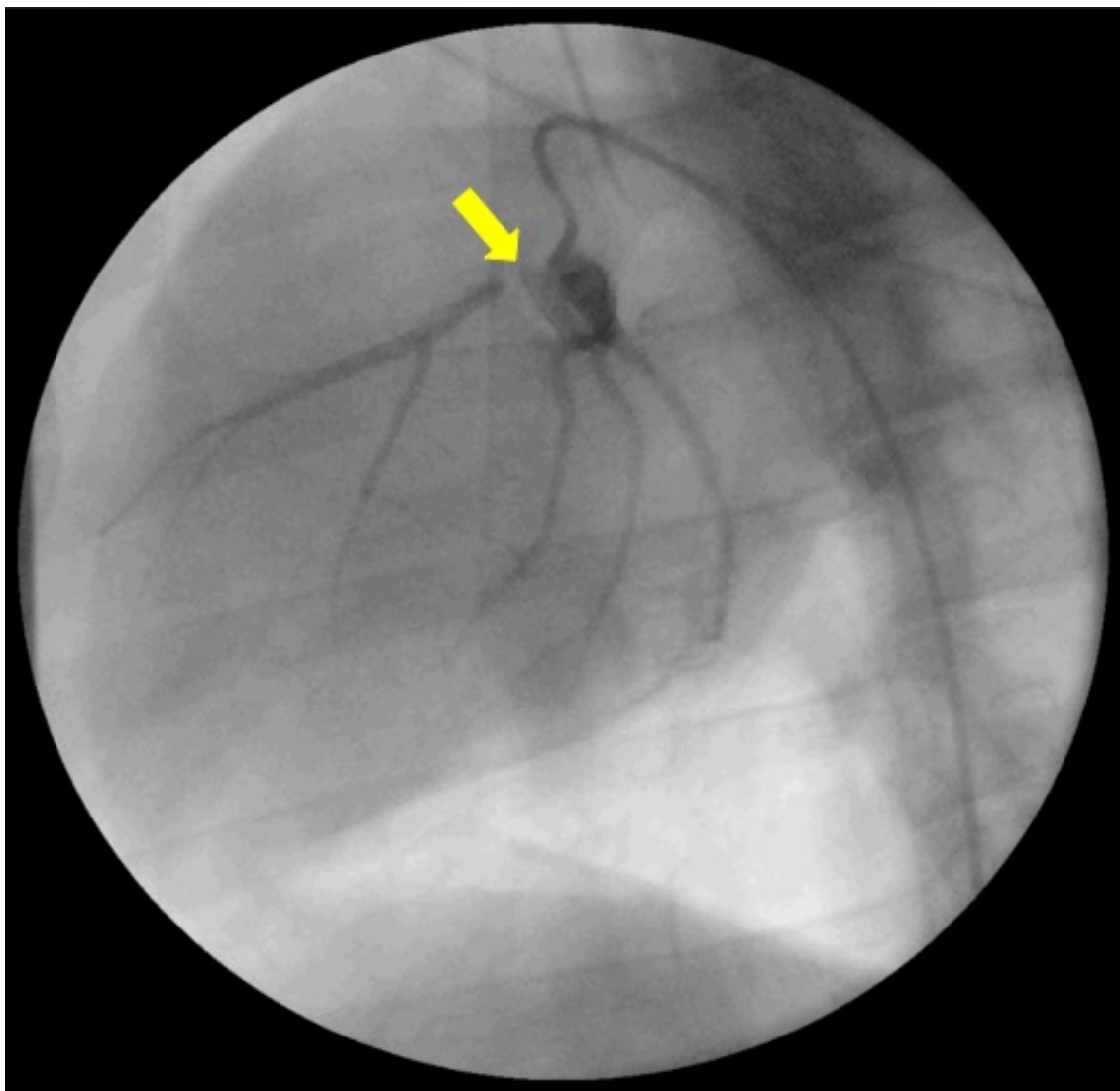


Figura 17. Coronariografía del árbol coronario izquierdo un animal donde se observa (flecha amarilla) oclusión de la ADA con relleno del territorio distal por circulación colateral homocoronaria. Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7).

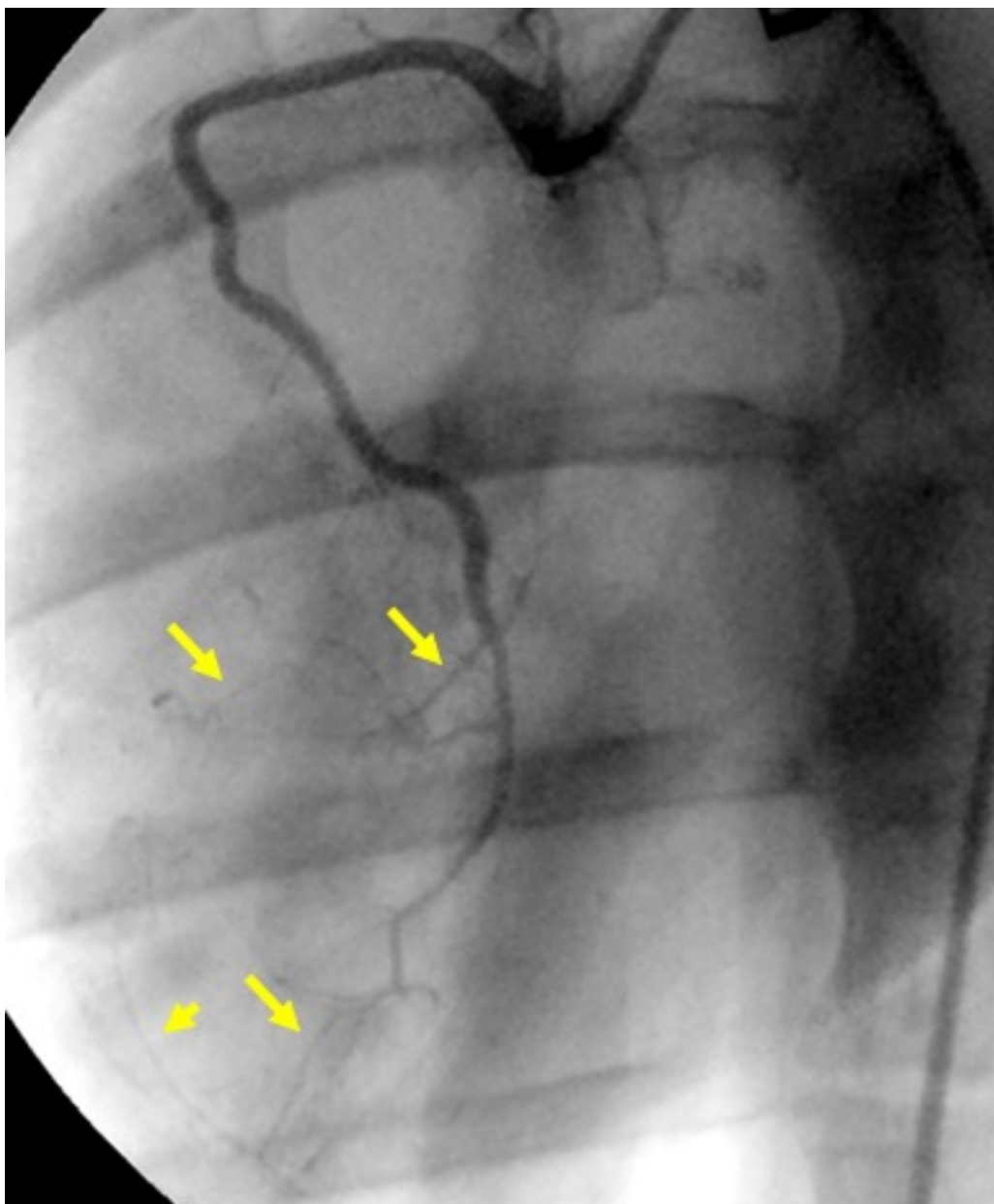


Figura 18. Coronariografía mostrando la coronaria derecha de un animal donde se observa (flechas amarillas) la presencia de circulación colateral heterocoronaria.

Con respecto a la RMC todos ellos presentaron DSVI con alteraciones segmentarias (aquinesia/hipoquinesia de un o más segmentos de la cara anterior) y LGE inferior al 50 % (ver figura 19).

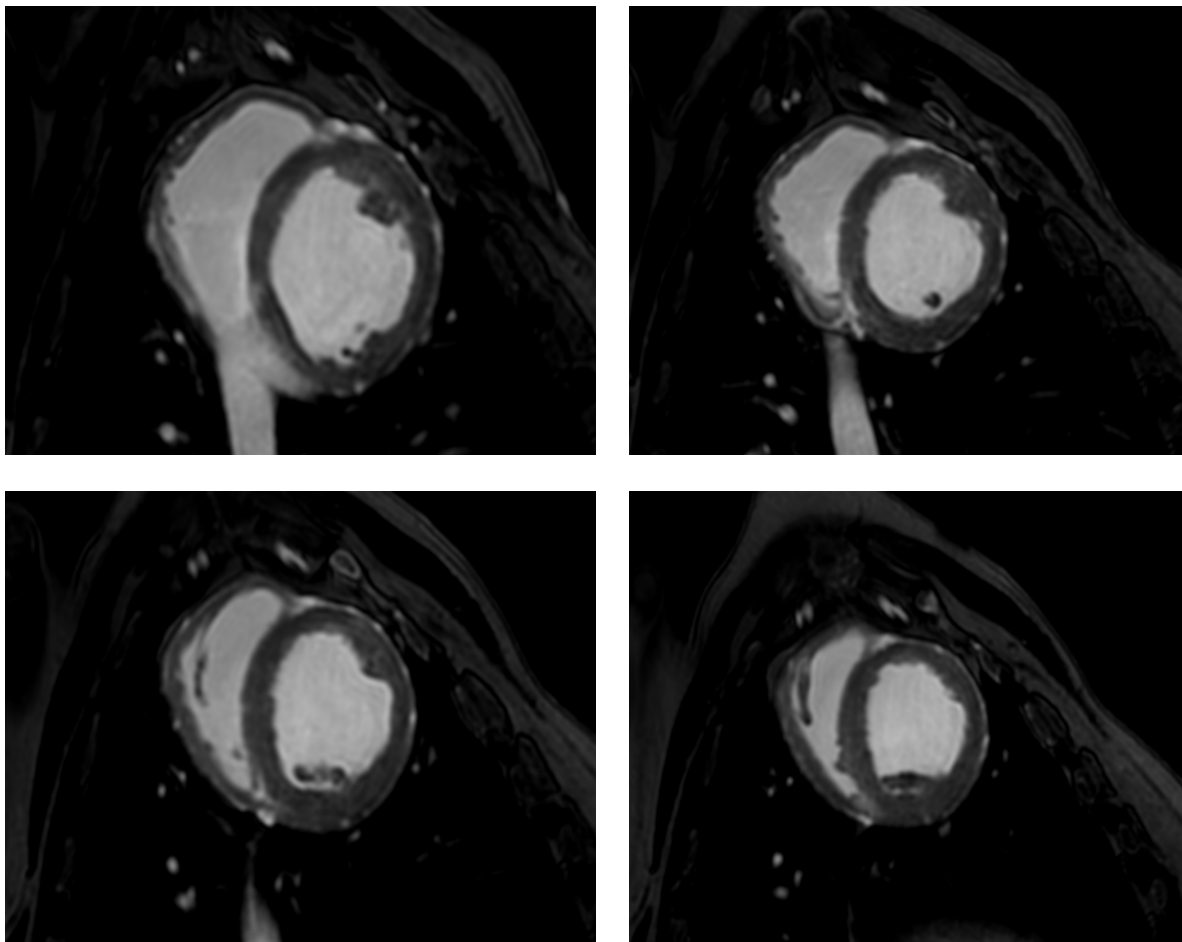
En la Tabla 4. podemos observar los hallazgos en detalle de cada uno de los animales en lo que respecta a la coronariografía y la RMC.

Crotal	Días hasta Oclusión ADA + DSVI	Estenosis ADA (%)	FEVI (%)	Alteraciones Segmentarias	LGE < 50 %
MH1	-	0	51	-	No
MH6	63	100	43	Hipoquinesia anterior	Si
MH8	62	100	21	Hipoquinesia global y aquinesia ant.	No
MH9	48	95	32	Hipoquinesia global y aquinesia ant.	Si
MH10	72	95	36	Aquinesia anterior	Si
MH11	56	100	32	Hipoquinesia global y aquinesia ant.	Si
MH13	56	100	33	Hipoquinesia global y aquinesia ant.	Si
MH14	67	99	35	Hipoquinesia global y aquinesia ant.	Si
MH15	67	100	37	Aquinesia anterior	Si
MH17	56	100	47	Hipoquinesia anterior	Si
MH18	49	100	35	Hipoquinesia global y aquinesia ant.	Si
MH19	54	99	37	Hipoquinesia global y aquinesia ant.	Si
MH24	52	100	43	Hipoquinesia anterior	Si
MH25	54	90	33	Hipoquinesia global y aquinesia ant.	Si
MH26	53	100	32	Hipoquinesia global y aquinesia ant.	Si

Crotal	Días hasta Oclusión ADA + DSVI	Estenosis ADA(%)	FEVI (%)	Alteraciones Segmentarias	LGE < 50 %
MH32	55	100	21	Hipoquinesia global y aquinesia ant.	Si
MH35	46	99	35	Hipoquinesia global y aquinesia ant.	Si
MH36	37	100	43	Hipoquinesia anterior.	Si
MH43	62	99	38	Hipoquinesia anterior	Si

Tabla 4. Características de los animales estudiados con imagen multimodal (supervivientes a 30 días). (ADA: arteria descendente anterior; DSVI: disfunción sistólica ventricular izquierda; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; LGE: captación tardía de gadolinio).

Figura 19. Secuencia de viabilidad de la RMC. Varios cortes en eje corto donde se



puede observar una LGE inferior al 50 %. Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7).

La mediana de la FEVI de los animales fue de 35 % (RI: 32,5-40,5 %) (figura 20). El tiempo medio transcurrido hasta la documentación de la estenosis significativa de la ADA fue y de la documentación de la DSVI 56 +/- 9 días (figura 21).

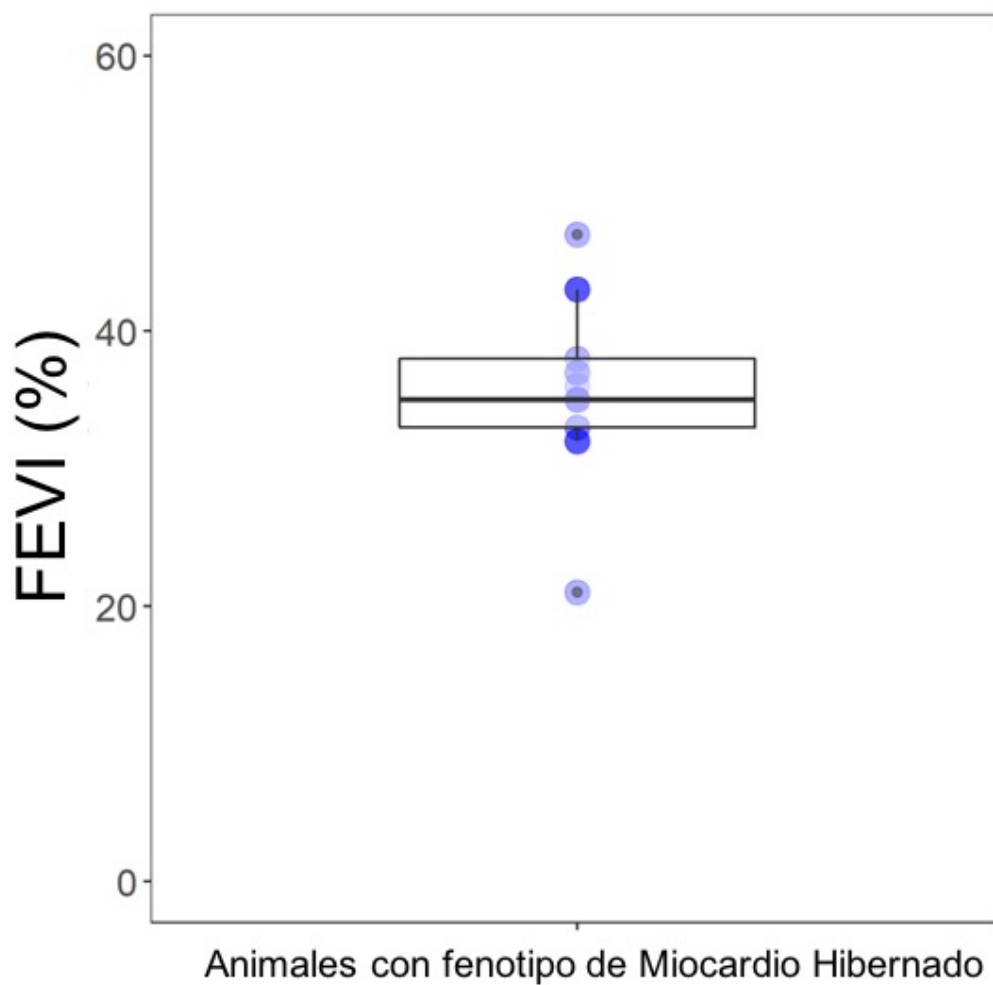


Figura 20. Box-Plot representando la FEVI de los animales que completan la primera fase del estudio. Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7).

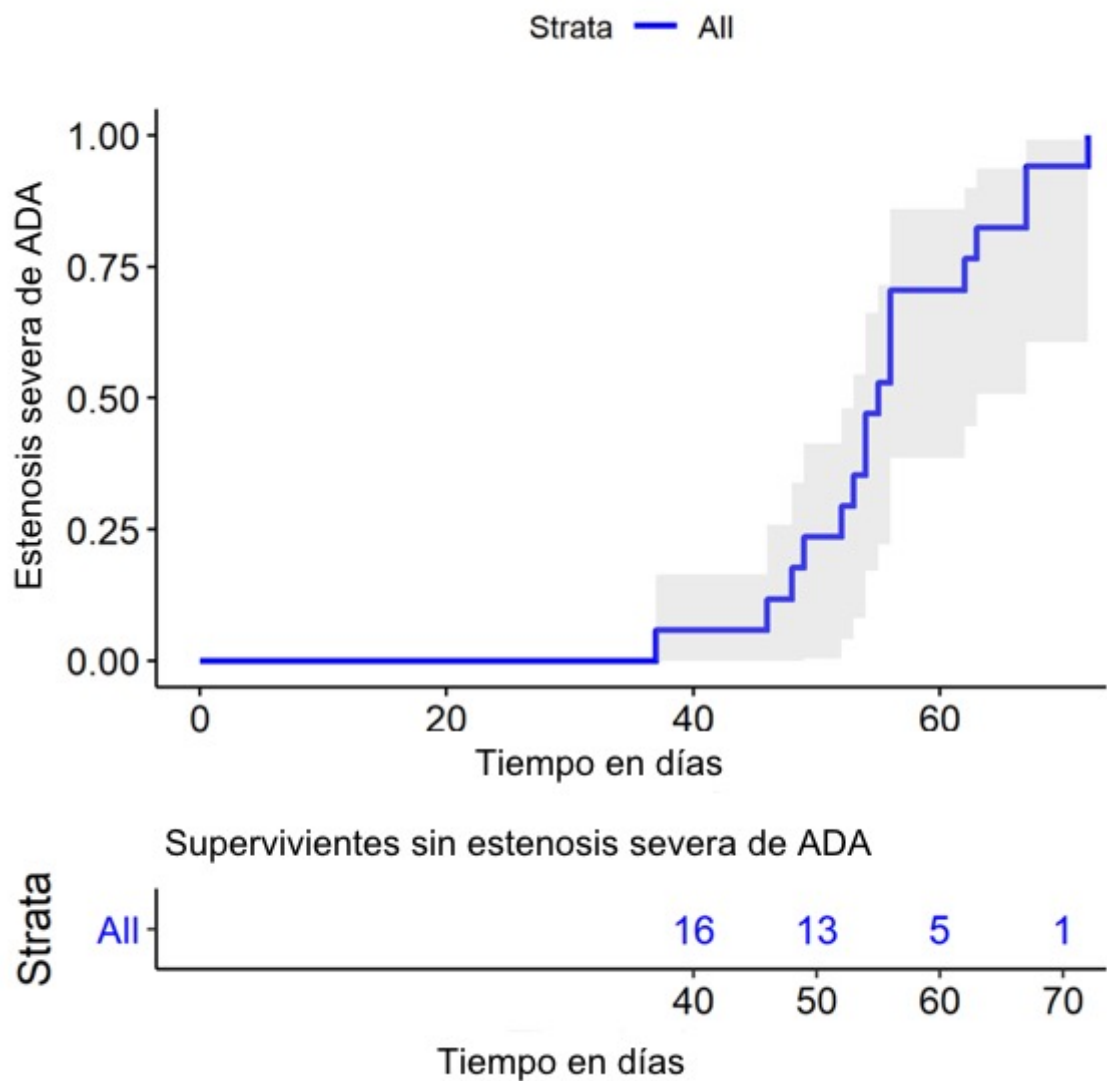


Figura 21. Kaplan-Meier representando el tiempo transcurrido hasta la estenosis severa de la ADA. Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7).

Se analizó la contractilidad regional de los animales incluidos mostrando una mediana del porcentaje de engrosamiento de la cara antero-septal de 13,0 % (RI:1,2 - 21,3 %) mientras que en la cara posterior (miocardio remoto) fue de 47,5 % (RI 33,0 - 69,8 %) (figura 22).

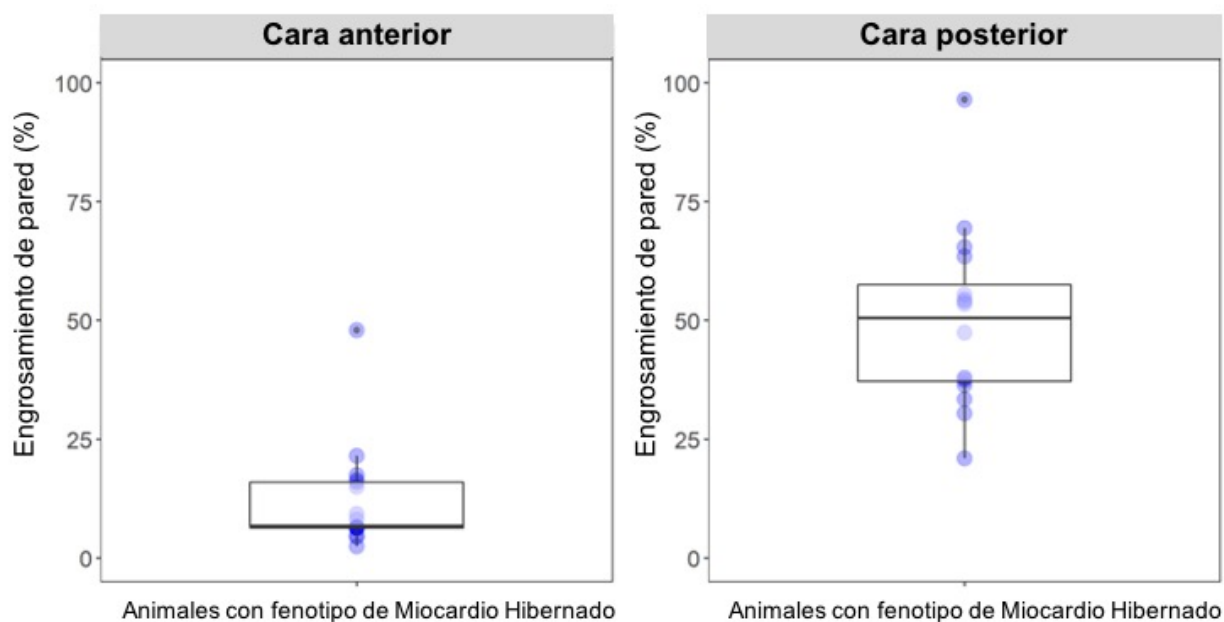


Figura 22. Box-plot comparando el engrosamiento de pared anterior (izquierda) y pared posterior (derecha) de los animales que completa el estudio. Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7).

Por otro lado, dentro del estudio de RMC también se analizó la secuencia de perfusión cuantitativa del territorio anterior (miocardio hibernado) presentando una mediana de 127,5 (RI: 116,5 - 140,5) ml/100g/min, mientras que en cara posterior (miocardio remoto) la mediana fue de 193,0 (RI: 166,0 - 211,5) ml/100g/min (figura 23).

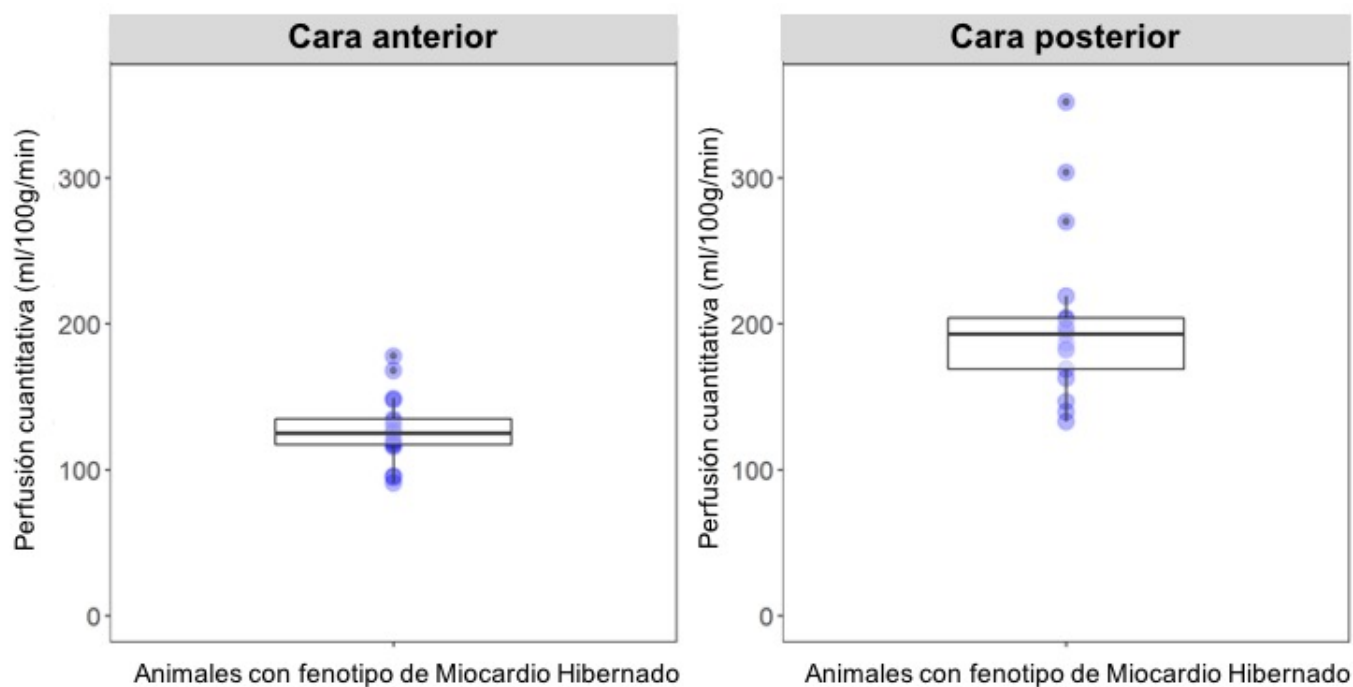


Figura 23. Box-plot comparando la perfusión cuantitativa de pared anterior (izquierda) y pared posterior (derecha) de los animales que completan el estudio. Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7).

Así mismo, también se llevó a cabo una cuantificación del grado de fibrosis miocárdica (daño irreversible sobre el VI), entendido como tal el porcentaje de LGE con respecto a la masa ventricular total. La mediana del porcentaje de LGE fue de 10,0 % (RI: 8,0 - 13,0 %) (Figura 24)

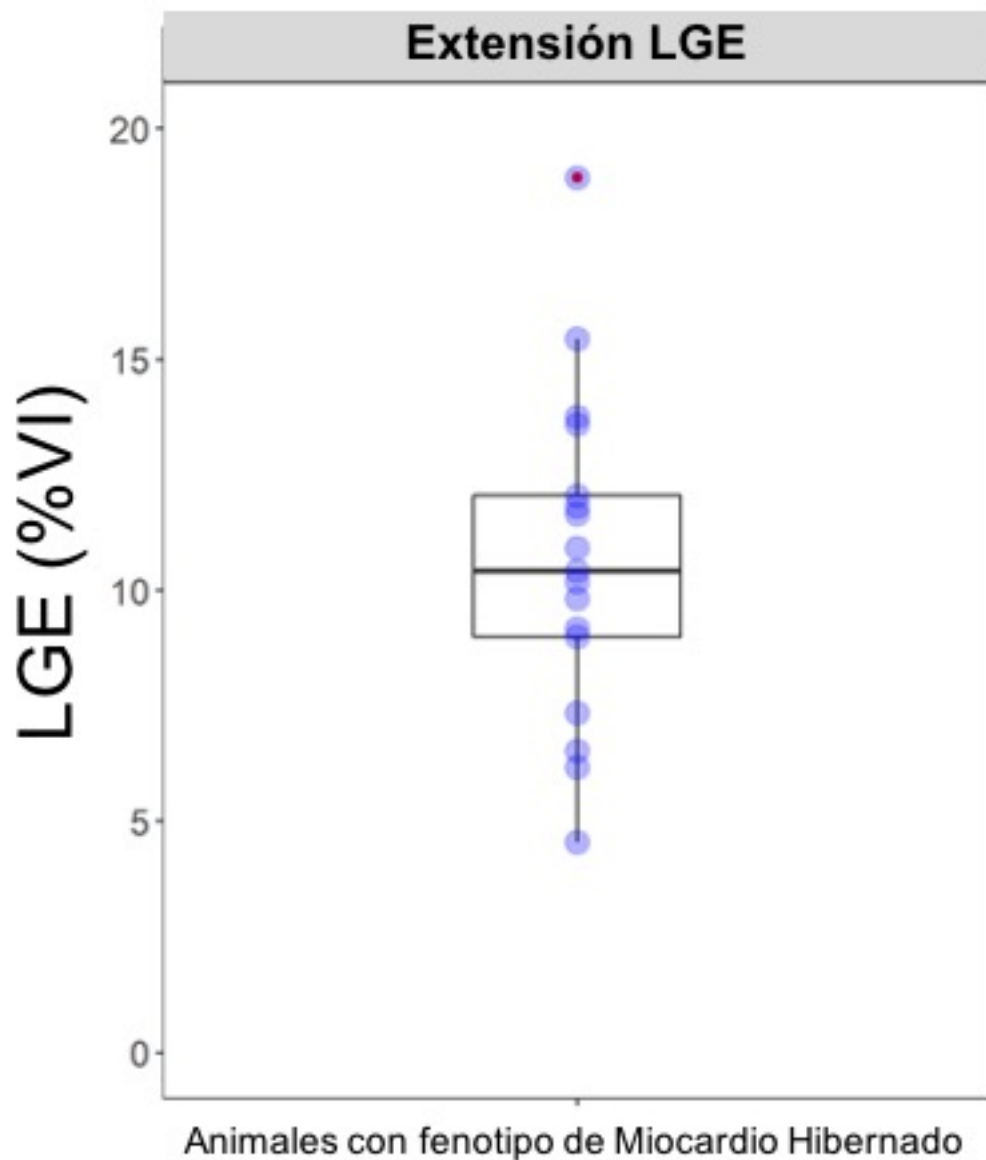


Figura 24. Box-plot mostrando el porcentaje de LGE total de todos los animales que completan la parte inicial del estudio. Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7).

Además de todo lo anterior, se realizó en 3 animales en los que estaba documentada la DSVI, una RMC de estrés empleando dobutamina como agente inotrópico con intención de valorar si se producía un incremento significativo de la FEVI

global (demostrando reserva contráctil), así como para evaluar la mejora en la contractilidad segmentaria.

Así las cosas, comprobamos que los 3 animales se producía un aumento significativo de la FEVI, pasando de una DSVI moderada-severa (FEVI 35,0 % (RI: 33,0 - 37,0 %) a una FEVI normal con la infusión de dobutamina (FEVI 64,0 % (RI: 60,0 - 67,0 %)). Así mismo, también se objetivó una mejora de la contractilidad segmentaria tanto a nivel del miocardio hibernado como en el área remota: el porcentaje de engrosamiento de la pared anterior (área hibernada) pasó de un 13,5 % (RI: 7,7 - 19,3 %) a un 43,5 % (RI: 27,5 - 67,0 %) con dobutamina; en la pared posterior (área remota) el cambio en el porcentaje de engrosamiento fue de un 50,0 % (RI: 33,8 - 67,8 %) a un 93,8 % (RI: 84,8 - 103,8 %) (ver figura 25 y 26).

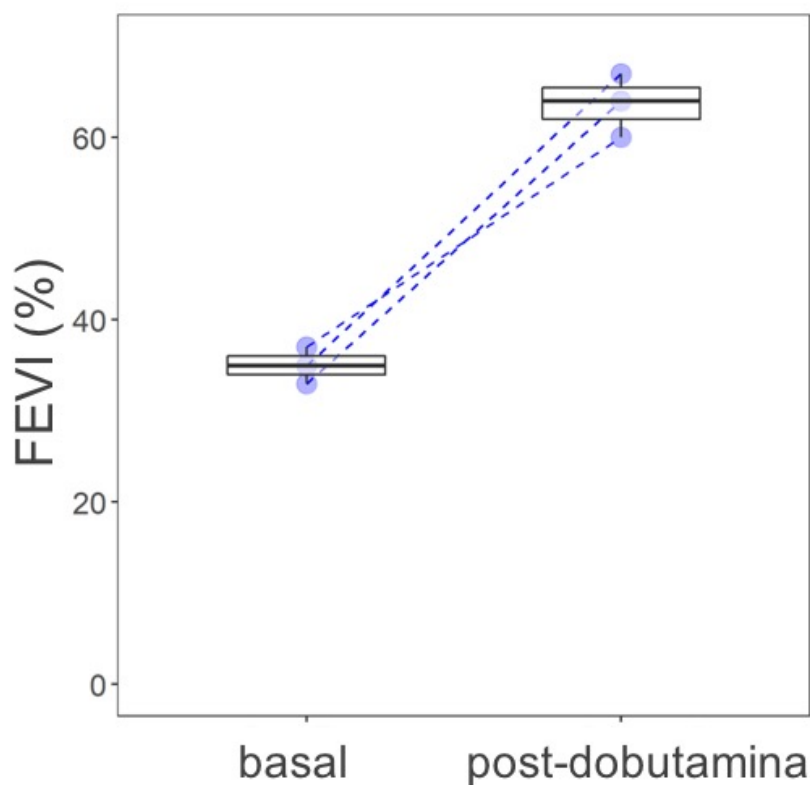


Figura 25. Box-plot mostrando el cambio de FEVI tras la administración de dobutamina en la RMC de estrés. Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7).

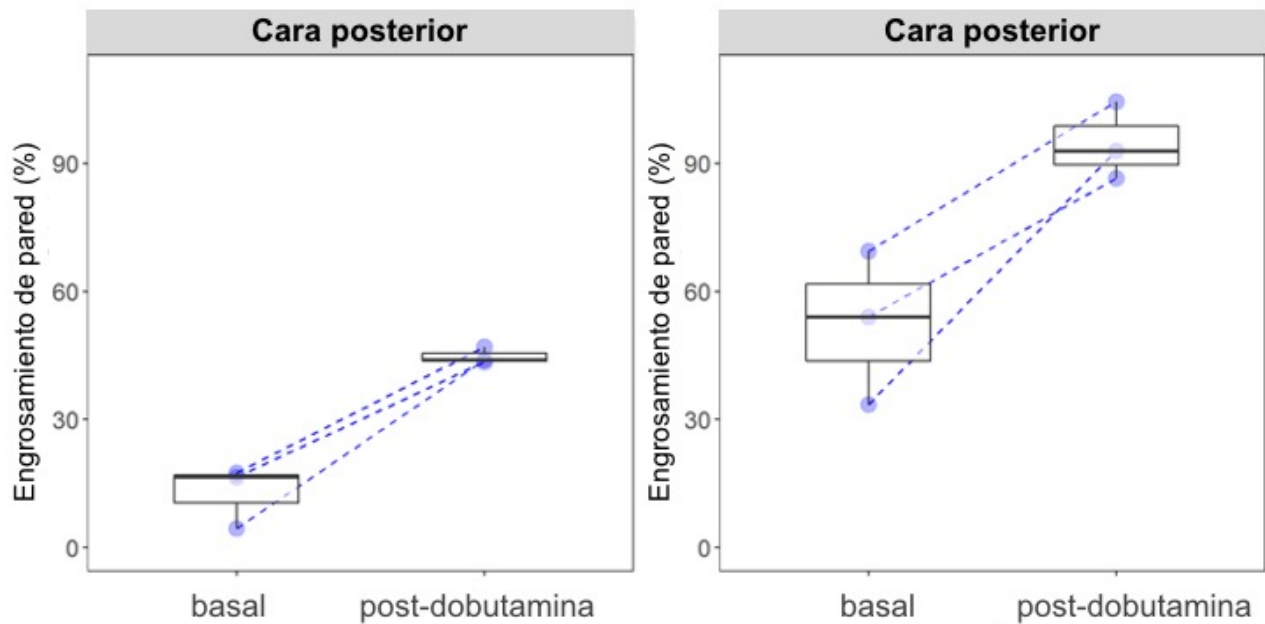


Figura 26. Box-plot mostrando el cambio en el engrosamiento de la pared anterior (izquierda) y posterior (derecha) tras la administración de dobutamina en la RMC de estrés. Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7).

Switch metabólico

De los 17 cerdos que mostraron FEVI deprimida y viabilidad de la RMC, 3 no pudieron someterse a PET/TAC debido a problemas técnicos. Tres cerdos sanos se sometieron al mismo protocolo de PET/TAC y sirvieron como controles. Por lo tanto, el estudio PET/TAC para evaluar la captación de glucosa del miocardio se realizó en 14

cerdos Los 14 cerdos intervenidos (100 %) mostraron un aumento manifiesto en la captación de glucosa normalizadas por sangre en el área isquémica, acinética/hipocinética del VI (número de cuentas de ^{18}F FDG (4,2 (RI: 3,4 - 8,4)), en comparación con la pared anterior del VI en los animales control (número de cuentas de ^{18}F FDG (2,9 (RI: 1,7 - 3,2)). Sin embargo, la captación de glucosa normalizadas por músculo en miocardio remoto (cara posterior) fue inferior (número de cuentas de ^{18}F FDG (2,7 (RI: 2,0 -3,6)) que a su vez era similar a la captación en la región posterior de VI de los animales control número de cuentas de ^{18}F FDG (3,0 (RI: 1,7 - 3,2)) (Figura 27).

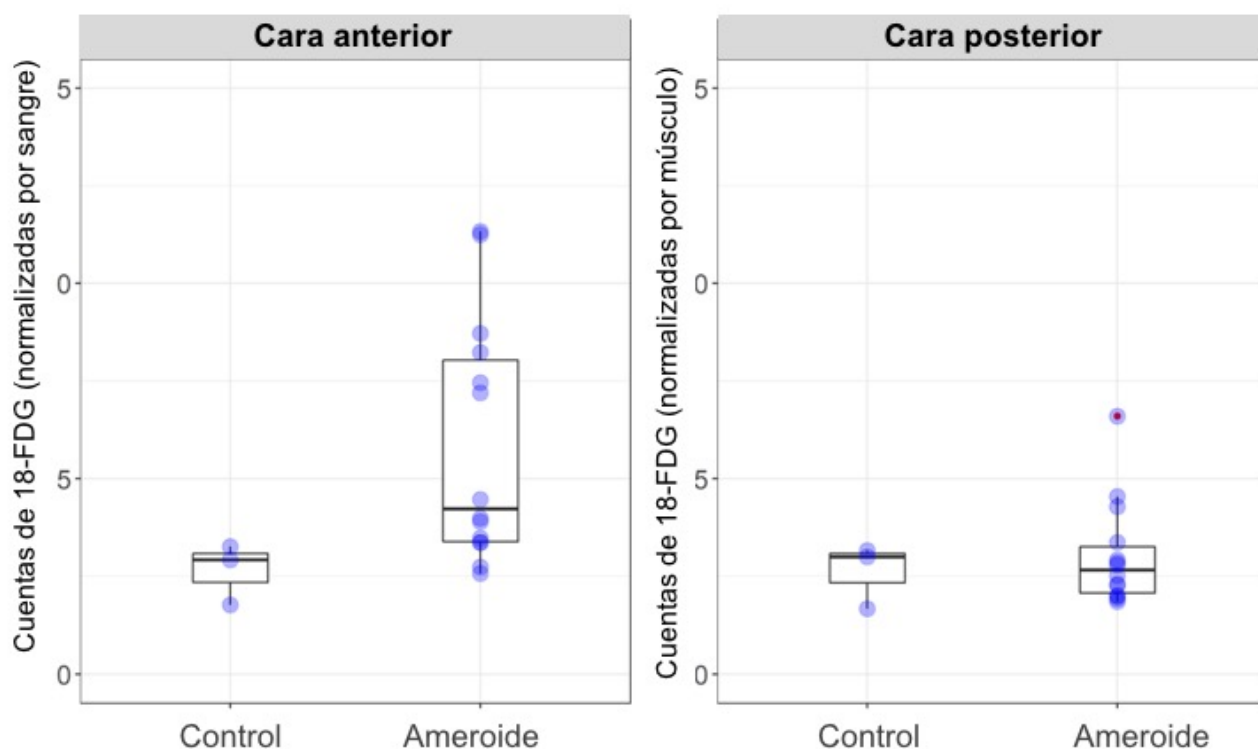


Figura 27. Box-plot comparando la captación de glucosa en la cara anterior (número de cuentas de ^{18}F FDG) en los animales con ameroide implantado y los controles (izquierda) así como en la cara posterior (número de cuentas normalizadas por músculo)(derecha). Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7).

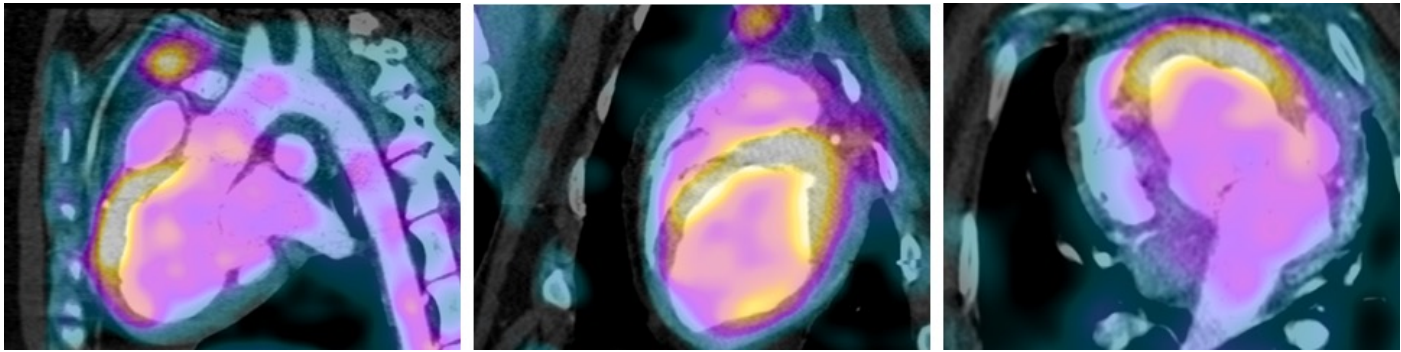


Figura 28. Imagen de PET/TAC con ^{18}F FDG donde se objetiva aumento de la captación de glucosa por el miocardio (áreas en color amarillo) representando el aumento de consumo de glucosa. Se representan tanto cortes coronal, sagital y axial. Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7).

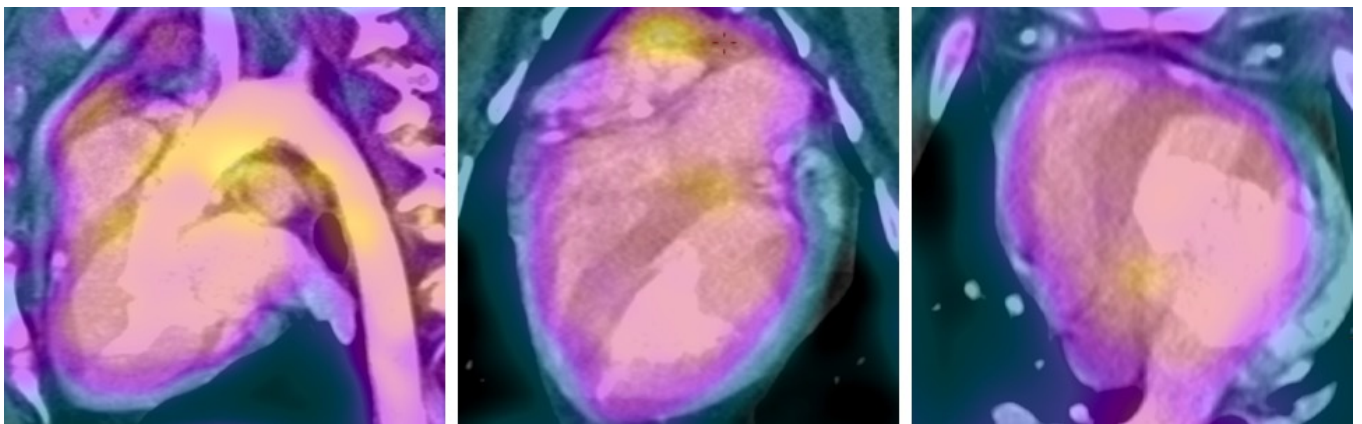


Figura 29. PET/TAC con ^{18}F FDG de uno de los animales control donde se puede ver una captación homogénea de ^{18}F FDG. Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7)

Histología

Un día después del estudio PET/TAC, se practicó la eutanasia a los cerdos y se extrajo el corazón. Se observó una fibrosis sustitutiva desigual en la pared anterior y lateral del VI (regiones de hibernación), pero no en el miocardio remoto (pared posterior). Estas zonas de fibrosis se encontraban principalmente en los niveles de corte coronal 3 y 4, y se acompañaban de neovascularización.

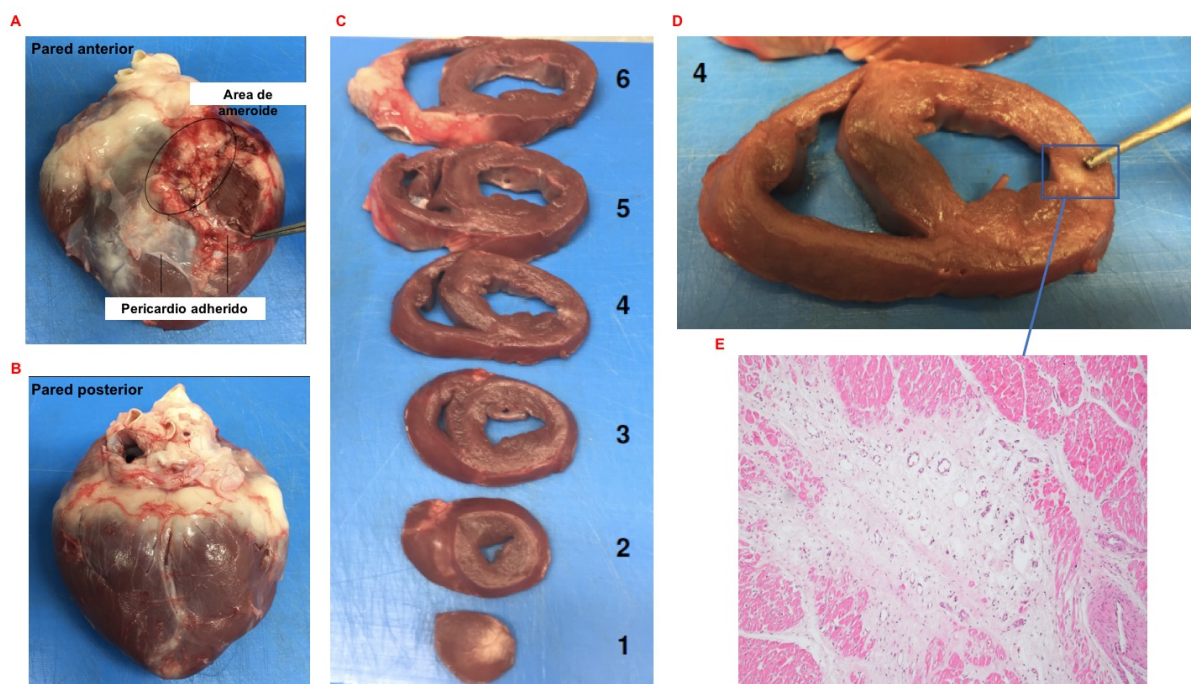


Figura 30. Imágenes ex-vivo de un animal que completó el protocolo. **A:** Vista macroscópica de la pared anterior del VI. **B:** Vista macroscópica de la pared posterior del VI. **C:** Vista macroscópica de 6 cortes coronales de un corazón operado. **D:** Corte coronal número 4 amplificado mostrando mínima fibrosis (cuadrado azul) y viabilidad de la pared anterior del VI. **E:** Vista microscópica del área de fibrosis desde el panel D. Obtenida del artículo original publicado por nuestro grupo (7).

5.2 Ensayo piloto de dieta grasa en MCD con miocardio hibernado

Una vez caracterizado el modelo de MCD isquémica con miocardio hibernado, se realizó un estudio piloto no aleatorizado para ver el potencial efecto de la dieta grasa en la función ventricular. Un total de 6 animales consecutivos con inducción de MCD con miocardio hibernado demostrado por imagen fueron sometidos a una dieta grasa (20 % de manteca) durante 8 semanas. Como controles se utilizaron 3 animales que se mantuvieron en dieta control durante 8 semanas posterior a la documentación de MCD y miocardio hibernado por RMC.

La función ventricular se cuantificó en RMC realizada justo antes de iniciar dieta grasa y al acabar el periodo de 8 semanas. Además, se realizó un estudio de PET/TAC con ^{18}F FDG antes y después del periodo de dieta.

En la tabla 5 podemos observar la FEVI previa y posterior al periodo de 8 semanas de dieta en animales que recibieron dieta grasa y aquellos que recibieron dieta control. De acuerdo con estos resultados, en el grupo que recibió dieta grasa, la FEVI media basal y tras 2 meses de dieta fue del 36,5 % (RI: 29,3 - 44,0 %) y 51,0 % (RI: 40,8 - 53,8 %) respectivamente. Por el contrario, el grupo de 3 animales que se mantuvo con dieta normal no sufrió cambios en la FEVI: 35,0 % (RI: 32,0 - 43,0 %) y 33,0 % (RI: 31,0 - 42,0 %) antes y después de los 2 meses de dieta control respectivamente. La figura 31 muestra los cambios de FEVI en ambos grupos.

	FEVI basal	FEVI tras 2 meses	Cambio absoluto de FEVI	Cambio relativo de FEVI
HFD1(MH17)	47 %	56 %	9 puntos	19,2 %
HFD2 (MH24)	43 %	52 %	9 puntos	20,9 %
HFD3 (MH26)	32 %	42 %	10 puntos	31,3 %
HFD4 (MH32)	21 %	37 %	16 puntos	76,2 %
HFD5 (MH35)	35 %	53 %	20 puntos	51,4 %
HFD6 (MH43)	38 %	50 %	12 puntos	31,6 %
Control1 (MH8)	43 %	42 %	-1 puntos	-2,3 %
Control2 (MH9)	32 %	31 %	-1 puntos	-3,1 %
Control3 (MH14)	35 %	33 %	-2 puntos	-5,7 %

Tabla 5. Comparativa de la FEVI del grupo que recibió dieta grasa en el estudio basal (previo a recibir dieta grasa) y tras dos meses de recibir dieta grasa. (FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo)

Se comparó la variación de la FEVI tras dos meses en el grupo de animales que recibieron dieta grasa (+ 31,3 % (RI: + 20,5 - 57,6 %) y en el grupo que recibió dieta estándar (-3,2 % [RI: -6,1 % - (-2,4 %)]) observándose que estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0,0196$) (figura 31).

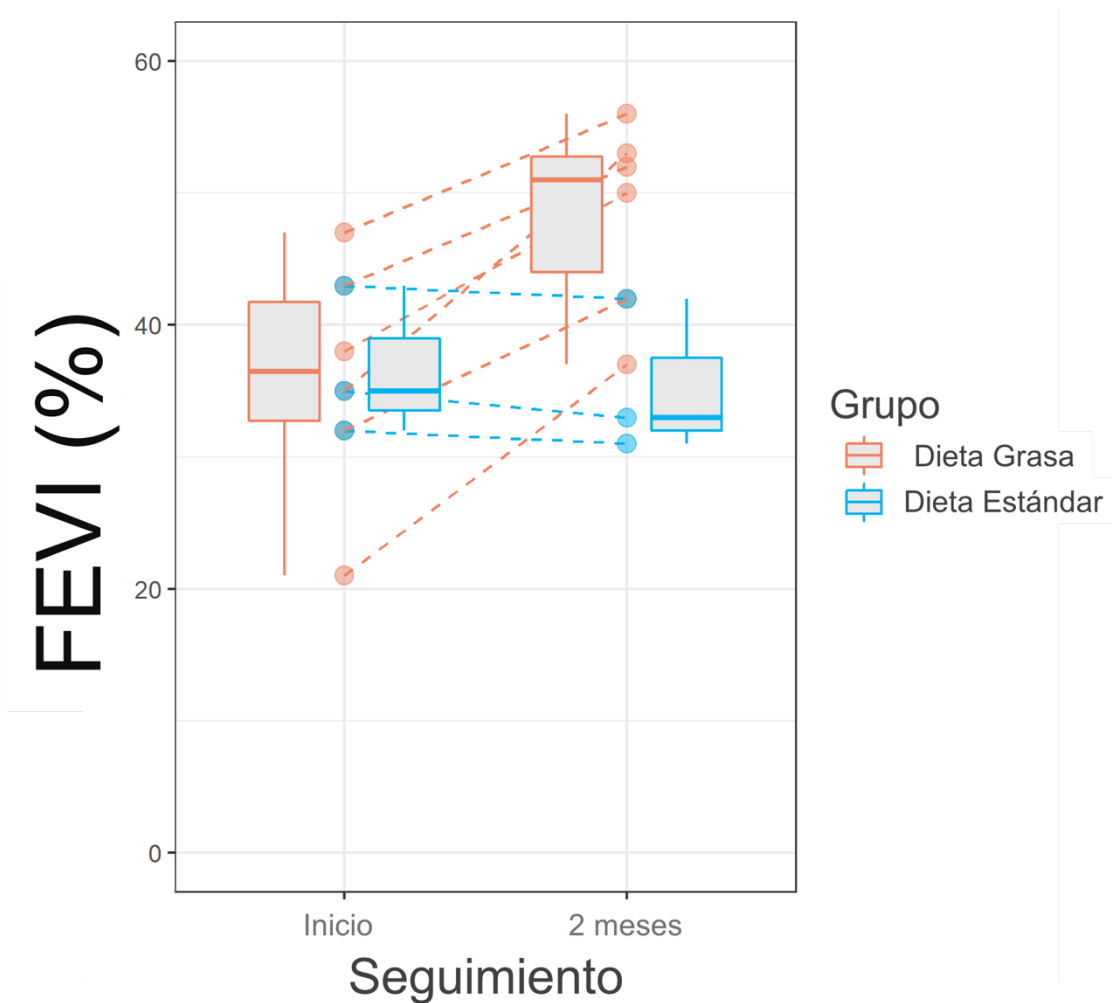


Figura 31. Grafica comparativa de las FEVI media basal y tras 2 meses de dieta grasa (naranja) o dieta estándar (azul). Los puntos representan cada una de las observaciones por separado.

En lo que respecta a la contractilidad regional, el grupo de animales que recibieron dieta grasa mostró un porcentaje de acortamiento fraccional de la cara anterior de 16,5 % (RI: 0,85 - 33,0 %) y de la cara posterior 52,0 % (RI: 41,5 - 81,8 %) en el estudio basal. El acortamiento fraccional se vio incrementado tras dos meses de recibir dieta grasa, siendo en la cara anterior 29,0 % (RI: 14,8 - 44,0 %) y en la cara posterior 64,5 % (RI: 50,3 - 92,0 %).

Por el contrario, los 3 animales que se mantuvieron con dieta control no mostraron cambios en la contractilidad regional: porcentaje de acortamiento de la cara anterior de 6,4 % (RI: -1,8 - 14,8 %) y de la cara posterior 33,5 % (RI: 22,5 - 53,3 %) en el estudio basal, y dos meses después el acortamiento de la cara anterior fue del 5,7 % (RI: 1,0 - 19,0 %) y en la cara posterior del 30,0 % (RI: 19,0 - 51,5 %).

En lo que referente al PET/TAC con ^{18}F FDG, se realizó en ambos grupos tras 2 meses de recibir grasa o estándar. En los animales que recibieron dieta grasa el número de cuentas de ^{18}F FDG en cara anterior normalizadas por sangre fue de 4,0 (RI: 3,8 - 7,2) basal y de 3,9 (RI: 3,3 - 7,9) tras la administración de dieta grasa. En el grupo control el número de cuentas de ^{18}F FDG en cara anterior normalizadas por sangre fue de 3,8 (RI: 3,2 - 4,3) basal y de 4,0 (RI: 3,6 - 4,6) al final del seguimiento. Por tanto, no se objetivaron diferencias entre ambos grupos ni tampoco con respecto a los estudios basales.

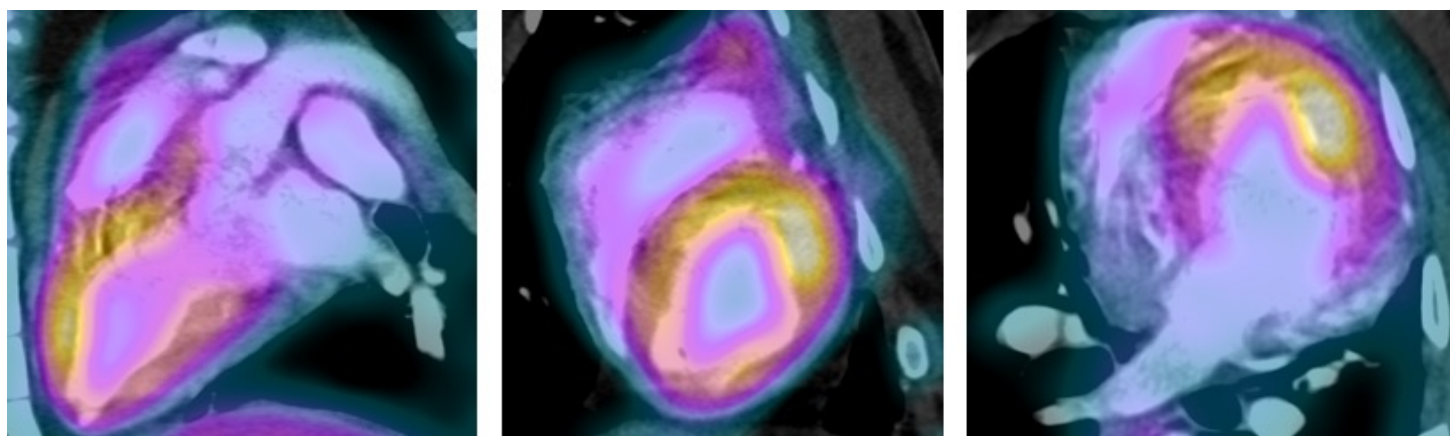


Figura 32. Imagen de PET/TAC de un animal tras recibir 2 meses de dieta grasa mostrando aumento de la captación de glucosa en el territorio anterior.

6. DISCUSIÓN

Para el desarrollo de las distintas terapias y métodos diagnósticos en cualquiera de las áreas de la medicina resulta de gran ayuda el desarrollo de modelos animales de experimentación lo más parecidos a los humanos, donde poder estudiar en profundidad las bases fisiopatológicas que explican el comportamiento de una determinada enfermedad. Así mismo la experimentación animal permite la implementación de las distintas técnicas diagnósticas y la búsqueda de diferentes terapias que actúen en un punto concreto de la fisiopatología mejorando o en el mejor de los casos curando la enfermedad. Con esta premisa nuestro proyecto de investigación ha utilizado un modelo animal para tratar de esclarecer determinados aspectos de la MCD por miocardio hibernado y testar de manera preliminar una terapia nutricional (basada en la administración de dieta grasa) como paso previo a un ensayo aleatorizado preclínico y posterior ensayo clínico.

6.1 Comparación de nuestro modelo con otros modelos animales de IC.

Los modelos de isquemia crónica con desarrollo de miocardio hibernado son muy complicados en animal grande y es por este motivo por el que no existe una literatura demasiado extensa con la que poder comparar nuestro modelo. En consonancia con las Guías Internacionales de Modelos Animales de Isquemia miocárdica, el modelo de miocardio hibernado tiene como principal ventaja su gran parecido a la realidad, algo que se contrapone al gran tiempo que consume su desarrollo (145). Este consenso establece que estos modelos de miocardio hibernado son los idóneos para probar distintas técnicas

de evaluación de la perfusión miocárdica, la biología molecular subyacente a la isquemia miocárdica y el metabolismo cardíaco (145).

De acuerdo con los diferentes estudios, los modelos animales de isquemia miocárdica se realizan mayoritariamente en ratones, perros y cerdos. De todos ellos el cerdo ofrece numerosas ventajas, la primera de ellas es que la relación del tamaño del corazón en base al tamaño corporal total es muy similar a la del humano (146), la segunda es que con solo 3-5 meses los cerdos tienen un sistema nervioso autónomo y un sistema vascular completamente desarrollado (147)(148) y por último estos animales tienen un escaso desarrollo de circulación colateral, lo que hace que el impacto a largo plazo de un evento isquémico sobre el corazón sea más evidente (149)(150). Es por esto que con el objetivo de ser lo más traslacional posible nuestro proyecto ha elegido el cerdo como animal donde llevar a cabo este experimento.

Existen distintos modelos de isquemia miocárdica que pueden desencadenar en miocardio hibernado o aturdido. Una de las técnicas descritas para crear un modelo de estas características podría ser la estimulación ventricular prolongada a una frecuencia elevada ocasionando el fenómeno de taquicardiomiopatía en el que el corazón aparece disfuncionante, pero como se puede ver en distintos modelos animales, no se comporta como un miocardio hibernado ya que a los 24-48 horas de que la frecuencia cardíaca vuelva a la basal, la función cardíaca está normalizada (151). Otra técnica empleada y que parece consistente es la utilización de un fármaco quimioterápico que produzca afectación coronaria y/o miocárdica con la consiguiente DSVI, sin embargo estos modelos hacen que en la mayor parte de los casos los daños sean irreversibles y por tanto

tampoco encajen en el concepto de miocardio hibernado que se persigue en este estudio (152)(153)

Dentro de los modelos de isquemia crónica por actuación sobre una arteria coronaria podemos distinguir dos técnicas fundamentales: estenosis fija y estenosis variable. Todos ellos comparten el hecho de que producen en menor o mayor medida (oclusión total) una estenosis de la arteria, con la consiguiente limitación de la cantidad de flujo sanguíneo que llega al área miocárdica subsidiaria de la arteria donde se ha actuado (154). La principal diferencia entre ambos es que en la estenosis variable, casi siempre llevada a cabo mediante un ameroide, se va produciendo una estenosis progresiva de la arteria a medida que el animal va creciendo (y con ello sus arterias) sumado al engrosamiento del elemento constrictor hacia la arteria (155). Sin embargo, la estenosis fija produce desde el inicio un mismo grado de estenosis invariable con el paso del tiempo (154)(156).

De ambas, la técnica más ampliamente extendida para el desarrollo de modelos de miocardio hibernado es el de estenosis progresiva ya que, en primer lugar, reproduce de una manera más parecida a la realidad el desarrollo de la hibernación (estenosis progresiva, insuficiente desarrollo de colaterales, disfunción miocárdica progresiva..) algo que se ha visto en varios modelos (155)(157)(158) fundamentalmente en la arteria circunfleja y que nuestro estudio ha si corroborado tras el implante del ameroide en la ADA. La segunda de las posibles causas de su mayor uso es la facilidad técnica, ya que en una cirugía de no más de 60 minutos, se puede asegurar el correcto implante. Por último, también juega un papel el hecho de que no exista un dispositivo o técnica clara que produzca siempre el mismo nivel de estenosis en la opción de la estenosis fija, salvo

la ligadura total de la arteria que no reproduciría en el miocardio afecto las características de la hibernación, así como que en muchos casos el procedimiento quirúrgico y los posteriores cuidados son muchos más laboriosos, haciendo que su uso sea menor(154)(159).

Si comparamos nuestro modelo con otros que utilizan el ameroide, uno de los puntos que llama la atención es que nuestro modelo tiene una tasa de mortalidad (en torno al 56 %) significativamente mayor a la de otros que esta alrededor del 20-25 % (160–162)(163), lo que probablemente se deba a que en nuestro caso el implante del ameroide se realiza en la ADA y no en la circunfleja como en la mayoría de los otros modelos. Esto hace que haya mayor afectación miocárdica y por tanto más riesgo de muerte súbita. Pero si lo comparamos con otros modelos que utilizan la ADA (162)(164) como lugar de implante del ameroide nuestra mortalidad también es mayor y probablemente sea por la conjunción de dos motivos: nuestro implante es en la parte más proximal de la ADA haciendo que técnicamente sea más difícil y en segundo lugar, de todos los que sobreviven y cumplen el protocolo se puede observar una oclusión total de la ADA, que hace suponer que en el resto que mueren en puntos intermedios, la ADA también se encuentre ocluida, mientras que el resto de modelos no reportan una tasa del 100 % de estenosis significativa de la ADA.

Los modelos con ameroide son utilizados desde hace mucho tiempo y el objeto fundamental de todos ellos es el estudio del miocardio hibernado, sin embargo, la información que hoy tenemos procede de distintos experimentos que han ido aplicando una u otra técnica y la han ido evaluando con distintos medios. En este punto es importante mencionar que muchos de los estudios con modelos animales de IC son de

mucho tiempo atrás y muchas de las técnicas diagnósticas hoy disponibles no lo estaban en su momento, es por esto que muchos estudios utilizan como herramienta para evaluar la función cardíaca, el ecocardiograma y en la mayor parte de ellos la viabilidad del miocardio afecto solo podía ser analizada post-mortem. En muchos estudios no hay coronariografía directa que permita analizar el desarrollo o no de circulación colateral y muchos no presentan estudio metabólico con PET/TAC(154)(158)(163)(164)(165). Nuestro proyecto, dada la dotación tecnológica del CNIC, ha permitido el desarrollo de un modelo de miocardio hibernado con afectación miocárdica extensa con un estudio completo con las técnicas diagnósticas punteras (coronariografía, resonancia magnética cardíaca con gadolinio, PET/TAC). Nuestro modelo reproduce de forma bastante realista, la forma de desarrollarse el miocardio hibernado en el humano, con oclusión progresiva de la ADA, disfunción ventricular progresiva con viabilidad en la RMC y *Switch metabólico* en el PET/TAC.

6.2 Terapias nutricionales y enfermedad cardiovascular

En el presente estudio se confirman datos obtenidos por Wai et al. (121) en un modelo de animal grande de IC-FEr, en donde un abordaje dietético que suponga un incremento del consumo de grasas con respecto a una dieta estándar resulta en una mejora clara y consistente de la función ventricular. Adicionalmente los resultados se han obtenido en un modelo animal de miocardio hibernado, siendo probablemente el primer estudio donde se demuestra que una dieta grasa puede ser beneficiosa incluso cuando hay un sustrato isquémico subyacente a la DSVI.

Es sabido que una dieta con alto contenido en grasas favorece el desarrollo de aterosclerosis y por tanto puede empeorar la situación de sujetos con enfermedad aterosclerótica conocida (166–168) y es por esto por lo que todas las recomendaciones nutricionales a sujetos con patologías cardiovasculares donde la isquemia podría jugar un papel, reducen al máximo el consumo de grasa. Sin embargo, el paradigma cambia cuando se observa que no todos los tipos de grasa tienen un efecto deletéreo para la salud cardiovascular. Aparecen estudios en los que los ácidos grasos poliinsaturados son protectores de la progresión de la aterosclerosis (169–171) y es por esto que pasan a ser recomendados en la práctica clínica habitual en sujetos con enfermedad aterosclerótica (172). Aunque en nuestro estudio piloto hemos utilizado manteca como suplemento graso, se podría optimizar el tipo de grasa antes de un eventual ensayo clínico para evitar grasas que puedan ser deletéreas desde el punto de vista de la pared arterial.

Desde el inicio de la investigación en IC, la intervención en la nutrición de los pacientes ha ido dirigida fundamentalmente al control de la ingesta de sodio, ya que una

dieta con alto contenido en sodio aumenta la congestión y por tanto se ve directamente relacionada con el aumento de los reingresos por IC(173,174). Así las cosas, durante un tiempo considerable, en los pacientes con diagnóstico de IC se recomendaba reducir al máximo la ingesta de sal y por tanto de sodio (175). Sin embargo el sodio es necesario para el correcto funcionamiento de los distintos aparatos y sistemas, observándose que una restricción importante de su ingesta (< 1500 mg) se asociaba a un aumento de la mortalidad por cualquier causa (176,177). Es por esto, que a día de hoy lo que parece claro es que tanto la restricción total como el exceso de sodio son dañina, pero no queda claro cual es la cantidad diaria recomendada de ingesta de sal en pacientes con IC (178).

Otra de las intervenciones dietéticas en las que se ha tratado de esclarecer el papel que juega sobre el sistema cardiovascular, es la aplicación de la dieta mediterránea en distintas patologías, una dieta basada en ácidos grasos monoinsaturados, pero baja en ácidos grasos saturados. En el estudio PREDIMED, se puede observar como una dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra, administrada a sujetos con alto riesgo de sufrir un evento cardiovascular, reducía de forma significativa la incidencia del objetivo compuesto de muerte cardiovascular + evento cardiovascular mayor (IAM o Ictus) (179).

Sin embargo el papel de la dieta mediterránea en la IC no ha sido estudiado de forma directa y los datos que disponemos en la actualidad son indirectos y contradictorios ya que aparecen estudios en los que no tiene un efecto positivo en reducción de reingresos/muerte por IC (180)(181,182) y estudios donde podría ser beneficiosa (183)(184).

De lo expuesto anteriormente, se puede extraer la conclusión de que la mayor parte de las intervenciones nutricionales a diferentes niveles tratan de prevenir nuevos eventos, pero prácticamente ninguna de ellas, tiene como objetivo la actuación directa sobre un elemento afectado por la enfermedad. Esto hace que nuestro estudio sea en este sentido novedoso ya que se propone que una intervención nutricional podría mejorar un parámetro tan importante en la IC como es la FEVI.

Dentro de aquellos estudios que han tratado de evaluar el papel de la dieta grasa en la función cardiaca, la mayor parte se han sido realizados en modelos de IC de roedor en los que no se inducía cardiopatía isquémica y aparecen datos en la línea de nuestros resultados, es decir mejorando la FEVI (133). De aquellos modelos en roedor donde se inducía cardiopatía isquémica mediante la ligadura de una de las arterias coronarias, en uno de ellos se observa una mejoría de la función cardiaca por ecocardiografía tras la administración de dieta grasa (137). Sin embargo, cuando nos dirigimos a buscar resultados similares en animal grande o humano solo aparecen dos estudios llevados a cabo en humano con MCD no isquémica en donde la administración de ácidos grasos poliinsaturados resulta en una mejoría significativa de la FEVI evaluada por ecocardiografía (142)(141).

En este sentido, nuestro estudio aparece como el primer estudio en evaluar el papel de una dieta grasa en un modelo de MCD isquémica con miocardio hibernado que reproduce las características descritas por otros autores, tanto a nivel de función como de metabolismo cardiaco y con la gran ventaja de que los resultados provienen de la aplicación de las técnicas *gold estándar* consideradas a día de hoy (RMC y PET/TAC).

6.3 Metabolismo cardiaco como diana terapéutica

El remodelado negativo protagonizado por el sistema renina-angiotensina-aldosterona y el sistema adrenérgico, así como la prevención de la muerte súbita han sido y siguen siendo a día de hoy las dianas hacia donde se han dedicado los esfuerzos en investigación en IC. Sin embargo, en la búsqueda de nuevos mecanismos que expliquen el deterioro de la función cardíaca, surge el metabolismo cardíaco.

Como se ha mencionado, el miocardio es el órgano con mayores necesidades de producción de ATP del organismo, y esta energía en condiciones normales es proporcionada por la beta-oxidación de los ácidos grasos. Sin embargo, en situaciones de IC, pasa a ser la glucosa el sustrato preferencial del miocardio, siendo entonces menos eficiente en términos de energía (112)(113). Así las cosas, aparecen estudios en los que una mayor disponibilidad de ácidos grasos para la beta-oxidación podría resultar en una mejora de la función ventricular (121)(141), hecho por el que nuestro estudio se plantea y cuyos resultados aportan más evidencia en este sentido.

Distintos fármacos han sido estudiados, como potenciales moduladores del metabolismo cardíaco. Uno de ellos es la perhexilina, un fármaco clásicamente utilizado como anti anginoso, que su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la carnitin-palmitoil transferasa-1 mitocondrial, la cual es una enzima que favorece la glicosilación en detrimento de la beta-oxidación en las mitocondrias de los cardiomiocitos(185). Por tanto, el uso de la perhexilina aumenta la beta-oxidación demostrando en ensayos clínicos aleatorizados que su uso resulta en mejoría de FEVI, eficiencia energética e incluso síntomas en pacientes con IC-FEr (186)(187).

Fármacos de más reciente comercialización son los inhibidores del co-transportador sodio-glucosa tipo 2 (empagliflozina, canagliflozina y dapagliflozina) que día de hoy están siendo foco de atención precisamente por el impacto que tienen en la reducción de mortalidad y reingresos por IC, probablemente mediado por un mecanismo distinto al anti-remodelado (188–190). Estos iSGLT2 actúan inhibiendo el co-transportador antes mencionado, situado en el túbulo proximal del riñón inhibiendo la reabsorción de glucosa a este nivel (191). Además de este efecto, se observa que los iSGLT2 producen un aumento significativo de los cuerpos cetónicos, así como de los ácidos grasos libres (192)(193).

Los cuerpos cetónicos son productos de degradación de los ácidos grasos en el hígado que a diferencia de ellos son solubles en agua y que aparecen de forma fisiológica en condiciones de ayuno prolongado, dietas restrictivas en hidratos de carbono o tras un ejercicio físico intenso (194). Estos cuerpos cetónicos, en determinadas situaciones pueden ser utilizados por los distintos órganos como fuente de energía vía la beta-oxidación, y en el miocardio podrían incluso ser más eficientes en términos de energía que los ácidos grasos (195)(196).

Este aumento que producen los iSGLT2 en el aporte de ácidos grasos y cuerpos cetónicos podría ser la explicación de sus beneficios en IC. De hecho, aparecen datos en estudios con modelos animales, fundamentalmente en roedor que objetivan mejoría de la FEVI así como prevención de empeoramiento de la misma en modelos animales de IC- FEr tanto isquémica como no isquémica tras la administración de iSGLT2 (197)(198)(199). Incluso hay datos preliminares del ensayo clínico DAPA-HF que en

pacientes no diabéticos con IC-FEr los iSGLT2 resultarían beneficiosos en términos de reducción de mortalidad (200).

Así las cosas, de lo expuesto anterior se podrían extraer datos que van en consonancia con lo observado en nuestro proyecto de investigación. Una mayor disponibilidad de ácidos grasos bien mediante fármacos o mediante un aumento en su ingesta va a resultar en una mayor eficiencia energética y probablemente en una mejor función cardíaca. Por tanto, el metabolismo cardíaco aparece claramente como una diana a considerar en el manejo de la IC, especialmente con FEVI reducida.

6.4 Evaluación del metabolismo cardíaco por PET/TAC

En el momento actual la técnica de imagen de elección para evaluar el consumo metabólico de una determinada molécula por parte del miocardio u otro órgano es el PET/TAC. La base en la que se sustenta el PET/TAC es la utilización de moléculas de isótopos radioactivos que generan una imagen de los fotones emitidos que a su vez refleja la distribución del radiotrazador en la totalidad del organismo o en una determinada estructura, reflejando de forma indirecta el consumo de moléculas análogas a los trazadores por parte de los distintos órganos (201).

Para la evaluación del metabolismo cardíaco se han descrito múltiples trazadores, siendo el ^{18}F FDG, el más utilizado por su larga vida media (2 horas aproximadamente) y la buena calidad de sus imágenes (202). Utilizar el ^{18}F FDG como trazador supone una evaluación directa del consumo de glucosa, pero indirecta de los ácidos grasos. En nuestro modelo esto se traduce en que cuando el animal desarrolla miocardio hibernado, se

produce un aumento de su consumo, pero con este trazador no somos capaces de evaluar el consumo de ácidos grasos, que suponemos está disminuido. Lo mismo ocurre cuando tras dos meses de consumo de grasa, la FEVI de los animales mejora, aquí observamos que el consumo de glucosa permanece más o menos invariable pero no sabemos qué ocurre con el de ácidos grasos. Nuestra hipótesis en este punto es que, aunque el consumo de glucosa permanece elevado, tras una dieta grasa se produce un aumento de consumo de ácidos grasos, haciendo más eficiente al corazón y en definitiva mejorando la función cardíaca. Esto es una limitación, de nuestro estudio ya que por el momento no hemos podido ver que ocurre con el consumo de ácidos grasos.

Aunque se han descrito distintos trazadores para evaluar la beta-oxidación de ácidos grasos por parte del miocardio como el ácido 14-(R,S)-18F-fluoro-6-thiaheptadecanoico (FTHA) o el 18F-fluoro-4-thia-palmitato (FTP), estos trazadores no están validados para el uso en modelos de experimentación con animal grande y por otro lado su uso conlleva un importante coste económico que hace muy difícil el poder llevar a cabo estudios de las magnitudes del nuestro (202).

A raíz de los hallazgos de nuestra investigación y siendo conscientes de la limitación que supone, conjuntamente con el equipo de Medicina Nuclear del CNIC se está desarrollando un trazador capaz de evaluar el consumo de ácidos grasos por parte del miocardio.

6.5 Direcciones futuras

Para concluir esta discusión, este proyecto tiene como futuras direcciones la realización de un ensayo aleatorizado en cerdos, con el fin de comprobar la hipótesis generada en este trabajo de que la dieta grasa podría mejorar la función contráctil cardiaca, que se encuentra en marcha en el momento de escribir esta tesis. Como segundo gran objetivo futuro es el llevar a cabo un estudio de imagen multimodal con RMC y PET/TAC en paciente con MCD que en la actualidad está en fase de reclutamiento. Por último, con el fin de trasladar el resultado de las investigaciones al paciente, se está comenzando el desarrollo de un ensayo clínico aleatorizado en pacientes con MCD en el que comprobar el efecto de la dieta grasa sobre la función cardiaca.

6.6 LIMITACIONES

1. La alta tasa de mortalidad del modelo de MCD con miocardio hibernado, alrededor del 55 %, aunque justificada por el implante del ameroide en la ADA proximal, supone que para reproducir el modelo desarrolla se necesita un volumen importante de animales.
2. La composición de la dieta grasa ha sido completamente arbitraria resultado de la decisión de añadir un 20 % extra de manteca a la dieta estándar que reciben estos animales.
3. El estudio de intervención debe considerarse como piloto y generador de hipótesis. No se realizó aleatorización y la evaluación de imagen no ha sido ciega. En la actualizada nuestro grupo está realizando un ensayo en cerdos aleatorizado, estratificado por FEVI basal, y con potencia estadística para demostrar diferencias significativas entre dieta grasa y dieta control.
4. Hubiera sido de interés el estudio de parámetros no miocárdicos, que pudieran haberse visto afectados por el empleo de una dieta grasa (función hepática, ateromatosis a otros niveles...) que se están considerando para ser analizados en futuros estudios.
5. Tanto en el desarrollo del modelo como en la evaluación del papel de la dieta grasa, el consumo de ácidos grasos por parte del corazón se hace de una manera indirecta, ya que no se ha utilizado un trazador específico que permita evaluar su consumo por parte del miocardio.

7. CONCLUSIONES

1. Se presenta un modelo de animal grande de IC con FEVI reducida (MCD isquémica por enfermedad coronaria no revascularizable), mediante el implante quirúrgico de un ameroide alrededor del segmento proximal de la arteria descendente anterior. Este modelo, a pesar de su considerable mortalidad reproduce de forma fiel la presentación del miocardio hibernado en el humano: estenosis coronaria progresiva, DSVI con viabilidad miocárdica de la región afecta y *Switch metabólico*.
2. Estos resultados apoyan que el *Switch metabólico* podría estar implicado en la fisiopatología de la disfunción ventricular en miocardio hibernado y en este caso una terapia nutricional podría resultar beneficiosa.
3. La administración de una dieta rica en grasa en animales en los que se ha desarrollado MCD con miocardio hibernado resulta en una mejoría significativa y consistente de la FEVI en todos los animales a los que se les ha administrado.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO - World Health Organization. World Health Statistics 2017 : Monitoring Health for The SDGs. World Health Organization. 2017.
2. World Health Organization. World Health Statistics 2013. World Health Statistic Report. 2013.
3. WHO. World Health Statistics 2010. WHO Library. 2010.
4. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. Heart. 2007;93(9):1137–46.
5. Luepker R V. Epidemiology of heart failure. In: Congestive Heart Failure and Cardiac Transplantation: Clinical, Pathology, Imaging and Molecular Profiles. 2017.
6. Kontis V, Bennett JE, Mathers CD, Li G, Foreman K, Ezzati M. Future life expectancy in 35 industrialised countries: projections with a Bayesian model ensemble. Lancet. 2017;389(10076):1323–35.
7. Martínez-Milla J, Galán-Arriola C, Carnero M, Cobiella J, Pérez-Camargo D, Bautista-Hernández V, et al. Translational large animal model of hibernating myocardium: characterization by serial multimodal imaging. Basic Res Cardiol [Internet]. 2020;115(3):33. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00395-020-0788-0>
8. Bonow RO, Louis S, Mann DL, Libby P. Heart Disease Braunwald ' S. American Journal of Hypertension. 2011.
9. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failureThe Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart

- failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of t. Eur Heart J. 2016;37(27):2129–200.
10. Segovia Cubero J, Alonso-Pulpón Rivera L, Pereira Moral R, Silva Melchor L. Etiología y evaluación diagnóstica en la insuficiencia cardíaca. Rev Esp Cardiol. 2004;57(3):250–9.
 11. Ponikowski A del G de TP, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. Guía ESC 2016 sobre el diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda y crónica. Rev Esp Cardiol. 2016;69(12):e1–85.
 12. Sayago-Silva I, García-López F, Segovia-Cubero J. Epidemiología de la insuficiencia cardíaca en España en los últimos 20 años. Rev Esp Cardiol. 2013;66(8):649–56.
 13. The World Bank. Population growth (annual %). The World Bank. 2018.
 14. ONU. World population prospects. ONU. 2015;
 15. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, et al. Heart disease and stroke statistics - 2018 update: A report from the American Heart Association. Circulation. 2018;137(12):e67–492.
 16. McMurray JJ. HEART FAILURE: Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. Heart. 2000;83(5):595–602.
 17. Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F, Guallar-Castillón P. Situación epidemiológica de la insuficiencia cardíaca en España. Rev Esp ardiol Supl. 2006;6(C):4c-9c.
 18. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in Prevalence and Outcome of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. N Engl J Med. 2006;355(3):251–9.
 19. Prensa N de. Encuesta de Morbilidad Hospitalaria. Año 2012. Inst Nac estadística. 2013;

20. Iwano H, Little WC. Heart failure: What does ejection fraction have to do with it? *J Cardiol*. 2013;62(1):1–3.
21. Maeder MT, Kaye DM. Heart Failure With Normal Left Ventricular Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(11):905–18.
22. Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Evans JC, Reiss CK, Levy D. Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: Prevalence and mortality in a population-based cohort. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33(7):1948–55.
23. Gerber Y, Weston SA, Redfield MM, Chamberlain AM, Manemann SM, Jiang R, et al. A contemporary appraisal of the heart failure epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *JAMA Intern Med*. 2015;175(6):996–1004.
24. Jeung M-Y, Germain P, Croisille P, Ghannudi S El, Roy C, Gangi A, et al. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2006;
25. Bursi F, Weston SA, Redfield MM, Jacobsen SJ, Pakhomov S, Nkomo VT, et al. Systolic and diastolic heart failure in the community. *J Am Med Assoc*. 2006;296(18):2209–16.
26. Gerber Y, Weston SA, Berardi C, McNallan SM, Jiang R, Redfield MM, et al. Contemporary trends in heart failure with reduced and preserved ejection fraction after myocardial infarction: A community study. *Am J Epidemiol*. 2013;178(8):1272–80.
27. Lam CSP, Gamble GD, Ling LH, Sim D, Leong KTG, Yeo PSD, et al. Mortality associated with heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a prospective international multi-ethnic cohort study. *Eur Heart J*. 2018;39(20):1770–80.

28. Vasan RS, Xanthakis V, Lyass A, Andersson C, Tsao C, Cheng S, et al. Epidemiology of Left Ventricular Systolic Dysfunction and Heart Failure in the Framingham Study: An Echocardiographic Study Over 3 Decades. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2018;11(1):1–11.
29. Pinto YM, Elliott PM, Arbustini E, Adler Y, Anastasakis A, Böhm M, et al. Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: A position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J*. 2016;37(23):1850–8.
30. Merlo M, Cannatà A, Gobbo M, Stolfo D, Elliott PM, Sinagra G. Evolving concepts in dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2018;20(2):228–39.
31. Ministerio de Sanidad SSEI. Manual de codificación CIE-10-ES Diagnósticos. Unidad Técnica Codif CIE-10-ES. 2016;
32. Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: 29th adult lung and heart-lung transplant report - 2012. *J Hear Lung Transplant*. 2012;31(10):1073–86.
33. Matsumura Y, Takata J, Kitaoka H, Kubo T, Baba Y, Hoshikawa E, et al. Long-term prognosis of dilated cardiomyopathy revisited: an improvement in survival over the past 20 years. *Circ J*. 2006;70(4):376–83.
34. Fuster V, Gersh BJ, Giuliani ER, Tajik AJ, Brandenburg RO, Frye RL. The natural history of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 1981;47(3):525–31.
35. Japp AG, Gulati A, Cook SA, Cowie MR, Prasad SK. The Diagnosis and Evaluation of Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(25):2996–

- 3010.
36. Rivera Otero M, Taléns-Visconti R, Jordán A, Sirera R, Sevilla B, Climent V, et al. Remodelado miocárdico y activación inmunitaria en pacientes con insuficiencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol*. 2006;59(9):911–8.
 37. Takano H, Hasegawa H, Nagai T, Komuro I. Implication of cardiac remodeling in heart failure: mechanisms and therapeutic strategies. *Intern Med*. 2003;42(6):465–9.
 38. Cleutjens JPM, Creemers EEJM. Integration of concepts: Cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail*. 2002;8(6 Suppl):S344–8.
 39. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The Pathogenesis of Coronary Artery Disease and Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med*. 1992;326(5):310–8.
 40. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). Fact sheet N°317, 17 May 2017. 2017.
 41. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Executive summary: Heart disease and stroke statistics-2016 update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(4):447–54.
 42. Ferreira-González I. The epidemiology of coronary heart disease. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2014;67(2):139–44.
 43. Ford ES, Ajani UA, Croft JB, Critchley JA, Labarthe DR, Kottke TE, et al. Explaining the Decrease in U.S. Deaths. *N Engl J Med*. 2007;356(23):2388–98.
 44. Ergin A, Muntner P, Sherwin R, He J. Secular trends in cardiovascular disease mortality, incidence, and case fatality rates in adults in the United States. *Am J Med*. 2004;117(4):219–27.

45. Lloyd-Jones DM, Meagher S, Kennedy R, Hay M, Banerji J, Campbell D, et al. Lifetime Risk for Developing Congestive Heart Failure: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2002;106(24):3068–72.
46. Gheorghiade M, Sopko G, Luca L De, Velazquez EJ, Parker JD, Binkley PF, et al. Navigating the crossroads of coronary artery disease and heart failure. *Circulation*. 2006;114(11):1202–13.
47. Khatibzadeh S, Farzadfar F, Oliver J, Ezzati M, Moran A. Worldwide risk factors for heart failure: A systematic review and pooled analysis. *Int J Cardiol*. 2013;168(2):1186–94.
48. Lala A, Desai AS. The role of coronary artery disease in heart failure. *Heart Fail Clin*. 2014;10(2):353–65.
49. Heusch G, Schulz R. Hibernating myocardium: A review. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28(12):2359–72.
50. Heusch G, Schulz R, Rahimtoola SH. Myocardial hibernation: a delicate balance. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2004;288(3):H984–99.
51. Schwarz ER, Schaper J, Vom Dahl J V., Althoefer C, Grohmann B, Schoendube F, et al. Myocyte degeneration and cell death in hibernating human myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(7):1577–85.
52. Depre C, Vatner SF. Mechanisms of cell survival in myocardial hibernation. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15(3):101–10.
53. Cleland JGF, Pennell DJ, Ray SG, Coats AJ, Macfarlane PW, Murray GD, et al. Myocardial viability as a determinant of the ejection fraction response to carvedilol in patients with heart failure (CHRISTMAS trial): Randomised controlled trial. *Lancet*. 2003;362(9377):14–21.
54. Brown TA. Hibernating myocardium. *Am J Crit Care*. 2001;10(2):84–91.

55. Vanoverschelde JLJ, Wijns W, Borgers M, Heyndrickx G, Depré C, Flameng W, et al. Chronic myocardial hibernation in humans. *Circulation*. 1997;95(7):1961–71.
56. Cwajg JM, Cwajg E, Nagueh SF, He ZX, Qureshi U, Olmos LI, et al. End-diastolic wall thickness as a predictor of recovery of function in myocardial hibernation: relation to rest-redistribution Tl-201 tomography and dobutamine stress echocardiography. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Apr;35(5):1152–61.
57. Ryan MJ, Perera D. Identifying and Managing Hibernating Myocardium: What’s New and What Remains Unknown? *Curr Heart Fail Rep*. 2018 Aug;15(4):214–23.
58. De Bruyne B, Pijls NHJ, Kalesan B, Barbato E, Tonino PAL, Piroth Z, et al. Fractional flow reserve-guided PCI versus medical therapy in stable coronary disease. *N Engl J Med*. 2012 Sep;367(11):991–1001.
59. Pennell DJ. Cardiovascular magnetic resonance: twenty-first century solutions in cardiology. *Clin Med*. 2003;3(3):273–8.
60. Mewton N, Liu CY, Croisille P, Bluemke D, Lima JAC. Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Feb;57(8):891–903.
61. Romero J, Xue X, Gonzalez W, Garcia MJ. CMR imaging assessing viability in patients with chronic ventricular dysfunction due to coronary artery disease: A meta-analysis of prospective trials. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2012;5(5):494–508.
62. Taylor MRG, Carniel E, Mestroni L. Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis*. 2006;1:27.
63. Manolio TA, Baughman KL, Rodeheffer R, Pearson TA, Bristow JD, Michels V

- V., et al. Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop). *Am J Cardiol.* 1992;69(17):1458–66.
64. Dec GW, Fuster V. Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *N Engl J Med* [Internet]. 1994 Dec 8;331(23):1564–75. Available from:
<https://doi.org/10.1056/NEJM199412083312307>
 65. Gillum RF. Idiopathic cardiomyopathy in the United States, 1970-1982. *Am Heart J.* 1986;111(4):752–5.
 66. Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(7):969–81.
 67. Hsu DT, Canter CE. Dilated cardiomyopathy and heart failure in children. *Heart Fail Clin.* 2010 Oct;6(4):415–32, vii.
 68. Towbin JA, Lowe AM, Colan SD, Sleeper LA, Orav EJ, Clunie S, et al. Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children. *J Am Med Assoc.* 2006;296(15):1867–76.
 69. Weintraub RG, Semsarian C, Macdonald P. Dilated cardiomyopathy. *Lancet* (London, England). 2017 Jul;390(10092):400–14.
 70. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE Jr DM et al. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure. *J Am Col Cardiol.* 2013;62(16):e147–239.
 71. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med.* 2000 Jan;342(3):145–53.
 72. Miller AJ, Arnold AC. The renin–angiotensin system in cardiovascular autonomic control: recent developments and clinical implications. *Clin Auton*

- Res. 2019;29(2):231–43.
73. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018 Sep;39(33):3021–104.
 74. Garg R, Yusuf S. Overview of Randomized Trials of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors on Mortality and Morbidity in Patients With Heart Failure. *JAMA J Am Med Assoc*. 1995;273(18):1450–6.
 75. Tai C, Gan T, Zou L, Sun Y, Zhang Y, Chen W, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers on cardiovascular events in patients with heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Cardiovasc Disord*. 2017 Oct;17(1):257.
 76. Burnett H, Earley A, Voors AA, Senni M, McMurray JJ V, Deschaseaux C, et al. Thirty Years of Evidence on the Efficacy of Drug Treatments for Chronic Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: A Network Meta-Analysis. *Circ Heart Fail*. 2017 Jan;10(1):e003529.
 77. Jong P, Demers C, McKelvie RS, Liu PP. Angiotensin receptor blockers in heart failure: Meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(3):463–70.
 78. Cheng J, Zhang W, Zhang X, Han F, Li X, He X, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers on all-cause mortality, cardiovascular deaths, and cardiovascular events in patients with diabetes mellitus: A meta-analysis. *JAMA Intern Med*. 2014;174(5):773–85.
 79. Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, et al. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: Randomised trial - The Losartan Heart Failure

- Survival Study ELITE II. *Lancet*. 2000;355(9215):1582–7.
80. Martínez-Milla J, Raposeiras-Roubín S, Pascual-Figal DA, Ibáñez B. Papel de los bloqueadores beta en la enfermedad cardiovascular en 2019. *Rev Española Cardiol* [Internet]. 2019;72(10):844–52. Available from: <https://www.revespcardiol.org/es-papel-los-bloqueadores-beta-enfermedad-avance-S0300893219301678>
 81. Packer M, Fowler MB, Roecker EB, Coats AJS, Katus HA, Krum H, et al. Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. *Circulation*. 2002 Oct;106(17):2194–9.
 82. Dargie HJ, Lechat P. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): A randomised trial. *Lancet*. 1999;353(9146):9–13.
 83. Hjalmarson Å, Goldstein S, Fagerberg B, Wedel H, Waagstein F, Kjeksus J, et al. Effects of Controlled-Release Metoprolol on Total Mortality, Hospitalizations, and Well-being in Patients With Heart Failure. *JAMA*. 2000;283(10):1295–302.
 84. Zannad F. Aldosterone and heart failure. *Eur Heart J*. 1995 Dec;16 Suppl N:98–102.
 85. Wang J, Yu L, Solenberg PJ, Gelbert L, Geringer CD, Steinberg MI. Aldosterone stimulates angiotensin-converting enzyme expression and activity in rat neonatal cardiac myocytes. *J Card Fail*. 2002;8(3):167–74.
 86. White PC. Aldosterone: Direct effects on and production by the heart. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(6):2376–83.
 87. Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Usukura M, Mabuchi H. Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy. *Circulation*.

- 2002;105(6):677–9.
88. Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C. Angiotensin at1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: Role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension*. 1999;33(4):981–6.
 89. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 1999;341(10):709–17.
 90. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, et al. Eplerenone, a Selective Aldosterone Blocker, in Patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2003;348(14):1309–21.
 91. Zannad F, McMurray JJ V, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, et al. Eplerenone in Patients with Systolic Heart Failure and Mild Symptoms. *N Engl J Med* [Internet]. 2011;364(1):11–21. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1009492>
 92. Singh JSS, Lang CC. Angiotensin receptor-neprilysin inhibitors: clinical potential in heart failure and beyond. *Vasc Health Risk Manag*. 2015;11:283–95.
 93. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. *J Pharmacol Sci*. 2005;99(1):6–38.
 94. Fryer RM, Segreti J, Banfor PN, Widomski DL, Backes BJ, Lin CW, et al. Effect of bradykinin metabolism inhibitors on evoked hypotension in rats: Rank efficacy of enzymes associated with bradykinin-mediated angioedema. *Br J Pharmacol*. 2008;153(5):947–55.
 95. McMurray JJ V, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, et al.

- Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med*. 2014 Sep;371(11):993–1004.
96. Swedberg K, Komajda M, Böhm M, Borer JS, Ford I, Dubost-Brama A, et al. Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): A randomised placebo-controlled study. *Lancet*. 2010;376(9744):875–85.
 97. Faris RF, Flather M, Purcell H, Poole-Wilson PA, Coats AJS. Diuretics for heart failure. *Cochrane database Syst Rev*. 2012 Feb;(2):CD003838.
 98. Group DI. The Effect of Digoxin on Mortality and Morbidity in Patients with Heart Failure. *N Engl J Med*. 1997;336(8):525–33.
 99. Ouyang AJ, Lv YN, Zhong HL, Wen JH, Wei XH, Peng HW, et al. Meta-Analysis of Digoxin Use and Risk of Mortality in Patients With Atrial Fibrillation. *Am J Cardiol*. 2015;115(7):901–6.
 100. Cohn JN, Archibald DG, Ziesche S, Franciosa JA, Harston WE, Tristani FE, et al. Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic congestive heart failure. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med*. 1986 Jun;314(24):1547–52.
 101. Taylor AL, Ziesche S, Yancy C, Carson P, D’Agostino R, Ferdinand K, et al. Combination of Isosorbide Dinitrate and Hydralazine in Blacks with Heart Failure. *N Engl J Med*. 2004;351(20):2049–57.
 102. GISSI-HF investigators. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008;372(9645):1223–30.
 103. Buxton AE. Not Everyone With an Ejection Fraction $\leq 30\%$ Should Receive an ICD. *Circulation*. 2005;111(19):2537–49.
 104. Connolly SJ, Hallstrom AP, Cappato R, Schron EB, Kuck KH, Zipes DP, et al.

- Metal-analysis of the implantable cardioverter defibrillator secondary prevention trials. *Eur Heart J*. 2000;21(24):2071–8.
105. McKenna CJ, Codd MB, McCann HA, Sugrue DD. Alcohol consumption and idiopathic dilated cardiomyopathy: a case control study. *Am Heart J*. 1998;135(5 Pt 1):833–7.
 106. Rouleau JL, Talajic M, Sussex B, Potvin L, Warnica W, Davies RF, et al. Myocardial infarction patients in the 1990s - Their risk factors, stratification and survival in Canada: The Canadian Assessment of Myocardial Infarction (CAMI) study. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(5):1119–27.
 107. Cauty JMJ, Suzuki G, Banas MD, Verheyen F, Borgers M, Fallavollita JA. Hibernating myocardium: chronically adapted to ischemia but vulnerable to sudden death. *Circ Res*. 2004 Apr;94(8):1142–9.
 108. Bigger JT. Prophylactic Use of Implanted Cardiac Defibrillators in Patients at High Risk for Ventricular Arrhythmias after Coronary-Artery Bypass Graft Surgery. *N Engl J Med* [Internet]. 1997 Nov 27;337(22):1569–75. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJM199711273372201>
 109. Kerwin WF, Botvinick EH, O’Connell JW, Merrick SH, Demarco T, Chatterjee K, et al. Ventricular contraction abnormalities in dilated cardiomyopathy: Effect of biventricular pacing to correct interventricular dyssynchrony. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(5):1221–7.
 110. Grines CL, Bashore TM, Boudoulas H, Olson S, Shafer P, Wooley CF. Functional abnormalities in isolated left bundle branch block. The effect of interventricular asynchrony. *Circulation*. 1989;79(4):845–53.
 111. Taegtmeyer H. Energy metabolism of the heart: From basic concepts to clinical applications applications. *Curr Probl Cardiol*. 1994;19(2):59–113.

112. Neubauer S. The Failing Heart — An Engine Out of Fuel. *N Engl J Med*. 2007;356(11):1140–51.
113. Braunwald E. Research advances in heart failure: A compendium. *Circ Res*. 2013;113(6):633–45.
114. Hunter WG, Kelly JP, McGarrah RW, Kraus WE, Shah SH. Metabolic Dysfunction in Heart Failure: Diagnostic, Prognostic, and Pathophysiologic Insights From Metabolomic Profiling. *Curr Heart Fail Rep*. 2016;13(3):119–31.
115. Herrero P, Gropler RJ. Imaging of myocardial metabolism. *J Nucl Cardiol*. 2005;12(3):345–58.
116. Ingwall JS. Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc Res*. 2009;81(3):412–9.
117. Tuunanen H, Engblom E, Naum A, Någren K, Hesse B, Airaksinen KEJ, et al. Free fatty acid depletion acutely decreases cardiac work and efficiency in cardiomyopathic heart failure. *Circulation*. 2006;114(20):2130–7.
118. Dávila-Román VG, Vedala G, Herrero P, De Las Fuentes L, Rogers JG, Kelly DP, et al. Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(2):271–7.
119. Herrmann G DG jr. THE CHEMICAL NATURE OF HEART FAILURE*. *Ann Intern Med*. 1939;12(8):1233–44.
120. Kuzmicic J, del Campo A, López-Crisosto C, Morales PE, Pennanen C, Bravo-Sagua R, et al. Dinámica mitocondrial: un potencial nuevo blanco terapéutico para la insuficiencia cardíaca. *Rev Española Cardiol*. 2011;64(10):916–23.
121. Wai T, García-Prieto J, Baker MJ, Merkwirth C, Benit P, Rustin P, et al. Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. *Science (80-)*. 2015;350(6265):aad0116.

122. Scheffler IE. A century of mitochondrial research: Achievements and perspectives. *Mitochondrion*. 2001;1(1):3–31.
123. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(11):870–9.
124. Ehses S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, et al. Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol*. 2009;187(7):1023–36.
125. Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol*. 2007;178(5):749–55.
126. Jiang X, Jiang H, Shen Z, Wang X. Activation of mitochondrial protease OMA1 by Bax and Bak promotes cytochrome c release during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(41):14782–7.
127. Baker MJ, Lampe PA, Stojanovski D, Korwitz A, Anand R, Tatsuta T, et al. Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics. *EMBO J*. 2014;
128. Hirokawa N, Takemura R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(3):201–14.
129. Saxton WM, Hollenbeck PJ. The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 9):2095–104.
130. Knaapen P, Germans T, Knuuti J, Paulus WJ, Dijkmans PA, Allaart CP, et al. Myocardial energetics and efficiency: current status of the noninvasive approach. *Circulation*. 2007 Feb;115(7):918–27.
131. De las Fuentes L, Herrero P, Peterson LR, Kelly DP, Gropler RJ, Dávila-Román VG. Myocardial fatty acid metabolism: Independent predictor of left ventricular

- mass in hypertensive heart disease. *Hypertension*. 2003;41(1):83–7.
132. Ashrafian H, Frenneaux MP, Opie LH, Ashrafian H, Frenneaux MP. Metabolic Mechanisms in Heart Failure. *Circulation*. 2015;116(4):434–48.
 133. Stanley WC, Dabkowski ER, Ribeiro RF, O’Connell KA. Dietary fat and heart failure: Moving from lipotoxicity to lipoprotection. *Circ Res*. 2012;110(5):764–76.
 134. Sharma N, Okere IC, Duda MK, Johnson J, Yuan CL, Chandler MP, et al. High Fructose Diet Increases Mortality in Hypertensive Rats Compared to a Complex Carbohydrate or High Fat Diet. *Am J Hypertens*. 2007;20(4):403–9.
 135. Okere IC, Chess DJ, McElfresh TA, Johnson J, Rennison J, Ernsberger P, et al. High-fat diet prevents cardiac hypertrophy and improves contractile function in the hypertensive Dahl salt-sensitive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32(10):825–31.
 136. Okere IC, Young ME, McElfresh TA, Chess DJ, Sharov VG, Sabbah HN, et al. Low carbohydrate/high-fat diet attenuates cardiac hypertrophy, remodeling, and altered gene expression in hypertension. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 2006 Dec;48(6):1116–23.
 137. Berthiaume JM, Bray MS, McElfresh TA, Chen X, Azam S, Young ME, et al. The myocardial contractile response to physiological stress improves with high saturated fat feeding in heart failure. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2010;299(2):H410–21.
 138. Christopher BA, Huang HM, Berthiaume JM, McElfresh TA, Chen X, Croniger CM, et al. Myocardial insulin resistance induced by high fat feeding in heart failure is associated with preserved contractile function. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2010;299(6):H1917–27.

139. Galvao TF, Brown BH, Hecker PA, Oconnell KA, Oshea KM, Sabbah HN, et al. High intake of saturated fat, but not polyunsaturated fat, improves survival in heart failure despite persistent mitochondrial defects. *Cardiovasc Res*. 2012;93(1):24–32.
140. Galvao T, Hecker P, Brown B, O’Connell K, O’Shea K, Stanley W. High saturated fat intake improves survival in genetic cardiomyopathy compared to a high polyunsaturated fat diet or a low fat diet. *Circ Conf Am Hear Assoc Sci Sess*. 2011;
141. Moertl D, Hammer A, Steiner S, Hutuleac R, Vonbank K, Berger R. Dose-dependent effects of omega-3-polyunsaturated fatty acids on systolic left ventricular function, endothelial function, and markers of inflammation in chronic heart failure of nonischemic origin: A double-blind, placebo-controlled, 3-arm study. *Am Heart J*. 2011;161(5):915.e1-915.e9.
142. Nodari S, Triggiani M, Campia U, Manerba A, Milesi G, Cesana BM, et al. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on left ventricular function and functional capacity in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(7):870–9.
143. Mozaffarian D, Bryson CL, Lemaitre RN, Burke GL, Siscovick DS. Fish intake and risk of incident heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(12):2015–21.
144. Sanchez-Gonzalez J, Fernandez-Jimenez R, Nothnagel ND, Lopez-Martin G, Fuster V, Ibanez B. Optimization of dual-saturation single bolus acquisition for quantitative cardiac perfusion and myocardial blood flow maps. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2015 Feb;17:21.
145. Lindsey ML, Bolli R, Canty JM, Du XJ, Frangogiannis NG, Frantz S, et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J*

- Physiol - Hear Circ Physiol. 2018;314(4):H812–38.
146. Craft WA. Fifty Years of Progress in Swine Breeding. *J Anim Sci*. 1958;17(4):960–80.
 147. Buckley NM, Gootman PM, Yellin EL, Brazeau P. Age-related cardiovascular effects of catecholamines in anesthetized piglets. *Circ Res*. 1979;45(2):482–92.
 148. Gootman PM, Gootman N, Buckley BJ. Maturation of central autonomic control of the circulation. *Fed Proc*. 1983 Apr;42(6):1648–55.
 149. Patterson RE, Kirk ES. Analysis of coronary collateral structure, function, and ischemic border zones in pigs. *Am J Physiol*. 1983 Jan;244(1):H23–31.
 150. Tsang HG, Rashdan NA, Whitelaw CBA, Corcoran BM, Summers KM, MacRae VE. Large animal models of cardiovascular disease. *Cell Biochem Funct*. 2016;34(3):113–32.
 151. Shinbane JS, Wood MA, Jensen DN, Ellenbogen KA, Fitzpatrick AP, Scheinman MM. Tachycardia-induced cardiomyopathy: a review of animal models and clinical studies. *J Am Coll Cardiol*. 1997 Mar;29(4):709–15.
 152. Galán-Arriola C, Lobo M, Vílchez-Tschischke JP, López GJ, de Molina-Iracheta A, Pérez-Martínez C, et al. Serial Magnetic Resonance Imaging to Identify Early Stages of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *J Am Coll Cardiol*. 2019;77(3):779–91.
 153. Herman EH, Ferrans VJ. Preclinical animal models of cardiac protection from anthracycline- induced cardiotoxicity. *Semin Oncol*. 1998;25(Suppl 10):15–21.
 154. Hughes GC, Post MJ, Simons M, Annex BH. Translational physiology: Porcine models of human coronary artery disease: Implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. *J Appl Physiol*. 2003;94(5):1689–701.
 155. Inou T, Tomoike T, Watanabe K, Kikuchi Y, Mizukami M, Kurozumi T, et al. A

- newly developed X-ray transparent ameroid constrictor for study on progression of gradual coronary stenosis. *Basic Res Cardiol.* 1980;75(4):537–43.
156. Millard RW. Induction of functional coronary collaterals in the swine heart. *Basic Res Cardiol.* 1981;76(5):468–73.
 157. Roth DM, Maruoka Y, Rogers J, White FC, Longhurst JC, Bloor CM. Development of coronary collateral circulation in left circumflex Ameroid-occluded swine myocardium. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 1987;253(5 Pt 2):H1279–88.
 158. O’Konski MS, White FC, Longhurst J, Roth D, Bloor CM. Ameroid constriction of the proximal left circumflex coronary artery in swine. A model of limited coronary collateral circulation. *Am J Cardiovasc Pathol.* 1987;1(1):69–77.
 159. Giordano C, Kuraitis D, Beanlands RSB, Suuronen EJ, Ruel M. Cell-based vasculogenic studies in preclinical models of chronic myocardial ischaemia and hibernation. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13(3):411–28.
 160. Unger EF. Experimental evaluation of coronary collateral development. *Cardiovasc Res.* 2001;49(3):497–506.
 161. St. Louis JD, Chad Hughes G, Kypson AP, DeGrado TR, Donovan CL, Edward Coleman R, et al. An experimental model of chronic myocardial hibernation. *Ann Thorac Surg.* 2000;69(5):1351–7.
 162. Tarkia M, Stark C, Haavisto M, Kentala R, Vähäsilta T, Savunen T, et al. Cardiac remodeling in a new pig model of chronic heart failure: Assessment of left ventricular functional, metabolic, and structural changes using PET, CT, and echocardiography. *J Nucl Cardiol.* 2015;22(4):655–65.
 163. Keeran KJ, Jeffries KR, Zetts AD, Taylor J, Kozlov S, Hunt TJ. A Chronic Cardiac Ischemia Model in Swine Using an Ameroid Constrictor. *J Vis Exp.*

2017 Oct;(128).

164. Fallavollita JA, Logue M, Canty JM. Stability of hibernating myocardium in pigs with a chronic left anterior descending coronary artery stenosis: Absence of progressive fibrosis in the setting of stable reductions in flow, function and coronary flow reserve. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(1989–1995).
165. Caillaud D, Calderon J, Réant P, Lafitte S, Dos Santos P, Couffignal T, et al. Echocardiographic analysis with a two-dimensional strain of chronic myocardial ischemia induced with ameroid constrictor in the pig. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010;10(5):689–93.
166. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan;340(2):115–26.
167. Watts GF, Jackson P, Burke V, Lewis B. Dietary fatty acids and progression of coronary artery disease in men. *Am J Clin Nutr.* 1996 Aug;64(2):202–9.
168. Kromhout D. Fatty acids, antioxidants, and coronary heart disease from an epidemiological perspective. *Lipids.* 1999;34 Suppl:S27-31.
169. Thies F, Garry JMC, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, et al. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet (London, England).* 2003 Feb;361(9356):477–85.
170. Wang C, Harris WS, Chung M, Lichtenstein AH, Balk EM, Kupelnick B, et al. n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2006 Jul;84(1):5–17.
171. Matsumoto M, Sata M, Fukuda D, Tanaka K, Soma M, Hirata Y, et al. Orally administered eicosapentaenoic acid reduces and stabilizes atherosclerotic lesions

- in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2008 Apr;197(2):524–33.
172. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2020 Aug;41(1):111–88.
 173. Michalsen A, König G, Thimme W. Preventable causative factors leading to hospital admission with decompensated heart failure. *Heart*. 1998;80(5):437–41.
 174. Tsuyuki RT, McKelvie RS, Arnold JMO, Avezum A. J, Barretto ACP, Carvalho ACC, et al. Acute precipitants of congestive heart failure exacerbations. *Arch Intern Med*. 2001;161(19):2337–42.
 175. Jessup M, Abraham WT, Casey DE, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, et al. 2009 focused update: ACCF/AHA guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults: A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines: Developed in collaboration with t. *Circulation*. 2009;114(19):1977–2016.
 176. Abshire M, Xu J, Baptiste D, Almansa JR, Xu J, Cummings A, et al. Nutritional Interventions in Heart Failure: A Systematic Review of the Literature. *J Card Fail*. 2015;21(12):989–99.
 177. Lennie TA, Song EK, Wu JR, Chung ML, Dunbar SB, Pressler SJ, et al. Three gram sodium intake is associated with longer event-free survival only in patients with advanced heart failure. *J Card Fail*. 2011;17(4):325–30.
 178. Mahtani KR, Heneghan C, Onakpoya I, Tierney S, Aronson JK, Roberts N, et al. Reduced Salt Intake for Heart Failure: A Systematic Review. *JAMA Intern Med*. 2018;178(12):1693–700.
 179. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*.

- 2013;368(14):1279–90.
180. Martínez-González MA, Gea A, Ruiz-Canela M. The Mediterranean Diet and Cardiovascular Health: A Critical Review. *Circ Res*. 2019;124(5):779–98.
 181. Singh RB, Dubnov G, Niaz MA, Ghosh S, Singh R, Rastogi SS, et al. Effect of an Indo-Mediterranean diet on progression of coronary artery disease in high risk patients (Indo-Mediterranean Diet Heart Study): A randomised single-blind trial. *Lancet*. 2002;360(9344):1455–61.
 182. de Lorgeril M, Renaud S, Salen P, Monjaud I, Mamelle N, Martin JL, et al. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet*. 1994;343(8911):1454–9.
 183. Horn L Van, Yancy C. Diet: Prevention and therapy for heart failure? *Circ Hear Fail*. 2013;6(6):1109–11.
 184. Fung TT, Rexrode KM, Mantzoros CS, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Mediterranean diet and incidence of and mortality from coronary heart disease and stroke in women. *Circulation*. 2009;119(8):1093–100.
 185. Ashrafian H, Horowitz JD, Frenneaux MP. Perhexiline. *Cardiovasc Drug Rev*. 2007;25(1):76–97.
 186. Lee L, Campbell R, Scheuermann-Freestone M, Taylor R, Gunaruwan P, Williams L, et al. Metabolic modulation with perhexiline in chronic heart failure: A randomized, controlled trial of short-term use of a novel treatment. *Circulation*. 2005;112(21):3280–8.
 187. Beadle RM, Williams LK, Kuehl M, Bowater S, Abozguia K, Leyva F, et al. Improvement in cardiac energetics by perhexiline in heart failure due to dilated cardiomyopathy. *JACC Hear Fail*. 2015;3(3):202–11.
 188. Wiviott SD, Raz I, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A, et al.


- Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2018 Nov 10;380(4):347–57.
189. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, de Zeeuw D, Fulcher G, Erondou N, et al. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2017 Jun 12;377(7):644–57.
190. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2015 Sep 17;373(22):2117–28.
191. Heise T, Jordan J, Wanner C, Heer M, Macha S, Mattheus M, et al. Acute Pharmacodynamic Effects of Empagliflozin With and Without Diuretic Agents in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Ther*. 2016;38(10):2248–64.
192. Ferrannini E, Baldi S, Frascerra S, Astiarraga B, Barsotti E, Clerico A, et al. Renal handling of ketones in response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2017;40(6):771–6.
193. Nishimura R, Tanaka Y, Koiwai K, Ishida K, Salsali A, Kaspers S, et al. Effect of Empagliflozin on Free Fatty Acids and Ketone Bodies in Japanese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Controlled Trial. *Adv Ther*. 2019 Aug;36(10):2769–82.
194. Laffel L. Ketone bodies: A review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 1999;15(6):412–26.
195. Veech RL. The therapeutic implications of ketone bodies: The effects of ketone bodies in pathological conditions: Ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2004;70(3):309–19.

196. Sato K, Kashiwaya Y, Keon CA, Tsuchiya N, King MT, Radda GK, et al. Insulin, ketone bodies, and mitochondrial energy transduction. *FASEB J*. 1995;9(8):651–8.
197. Byrne NJ, Parajuli N, Levasseur JL, Boisvenue J, Beker DL, Masson G, et al. Empagliflozin Prevents Worsening of Cardiac Function in an Experimental Model of Pressure Overload-Induced Heart Failure. *JACC Basic to Transl Sci*. 2017;2(4):347–54.
198. Verma S, Rawat S, Ho KL, Wagg CS, Zhang L, Teoh H, et al. Empagliflozin Increases Cardiac Energy Production in Diabetes: Novel Translational Insights Into the Heart Failure Benefits of SGLT2 Inhibitors. *JACC Basic to Transl Sci*. 2018;3(5):575–87.
199. Yurista SR, Silljé HHW, Oberdorf-Maass SU, Schouten EM, Pavez Giani MG, Hillebrands JL, et al. Sodium–glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin improves cardiac function in non-diabetic rats with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*. 2019;21(7):862–73.
200. McMurray JJV, DeMets DL, Inzucchi SE, Køber L, Kosiborod MN, Langkilde AM, et al. A trial to evaluate the effect of the sodium–glucose co-transporter 2 inhibitor dapagliflozin on morbidity and mortality in patients with heart failure and reduced left ventricular ejection fraction (DAPA-HF). *Eur J Heart Fail*. 2019;21(5):665–75.
201. Fernández-Friera L, García-Álvarez A, Ibáñez B. Imagining the Future of Diagnostic Imaging. *Rev Española Cardiol (English Ed)*. 2013;66(2):134–43.
202. Peterson LR, Gropler RJ. Radionuclide imaging of myocardial metabolism. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2010;3(2):211–22.

9. ARTÍCULO PUBLICADO COMO RESULTADO DE ESTA TESIS DOCTORAL



Translational large animal model of hibernating myocardium: characterization by serial multimodal imaging

Juan Martínez-Milla^{1,2} · Carlos Galán-Arriola^{1,3} · Manuel Carnero^{1,4} · Javier Cobiella^{1,4} · Daniel Pérez-Camargo^{1,4} · Víctor Bautista-Hernández^{1,5} · Montserrat Rigol^{3,6} · Nuria Solanes^{3,6} · Rocío Villena-Gutierrez¹ · Manuel Lobo¹ · Jesús Mateo¹ · Jean Paul Vilchez-Tschischke^{1,7} · Beatriz Salinas^{1,8,9,10} · Lorena Cussó^{1,8,9,10} · Gonzalo Javier López¹ · Valentín Fuster^{1,11} · Manuel Desco^{1,8,9,10} · Javier Sanchez-González¹² · Borja Ibanez^{1,2,3} 

Received: 26 February 2020 / Accepted: 2 March 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Nonrevascularizable coronary artery disease is a frequent cause of hibernating myocardium leading to heart failure (HF). Currently, there is a paucity of therapeutic options for patients with this condition. There is a lack of animal models resembling clinical features of hibernating myocardium. Here we present a large animal model of hibernating myocardium characterized by serial multimodality imaging. Yucatan minipigs underwent a surgical casein ameroid implant around the proximal left anterior descending coronary artery (LAD), resulting in a progressive obstruction of the vessel. Pigs underwent serial multimodality imaging including invasive coronary angiography, cardiac magnetic resonance (CMR), and hybrid ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography (FDG-PET/CT). A total of 43 pigs were operated on and were followed for 120 ± 37 days with monthly multimodality imaging. 24 pigs (56%) died during the follow-up. Severe LAD luminal stenosis was documented in all survivors. In the group of 19 long-term survivors, 17 (90%) developed left ventricular systolic dysfunction [median LVEF of 35% (IQR 32.5–40.5%)]. In 17/17, at-risk territory was viable on CMR and 14 showed an increased glucose uptake in the at-risk myocardium on ¹⁸FDG-PET/CT. The present pig model resembles most of the human hibernated myocardium characteristics and associated heart failure (systolic dysfunction, viable myocardium, and metabolic switch to glucose). This human-like model might be used to test novel interventions for nonrevascularizable coronary artery disease and ischemia heart failure as a previous stage to clinical trials.

Keyword Hibernating myocardium · Heart failure · Dilated cardiomyopathy · Large animal models · Metabolic switch · ¹⁸FDG-PET/CT · Cardiac magnetic resonance

Background

Ischemic heart disease (IHD) secondary to coronary artery disease (CAD) is a leading cause of morbidity and mortality worldwide and a frequent cause of heart failure (HF) [13, 23]. The prevalence of HF in developed countries is around 2% and it is estimated that about 150 million live with chronic HF worldwide [34].

Although percutaneous and surgical revascularizations have shown to be beneficial in CAD, these procedures are not always feasible, especially due to diffusely diseased vessels, leading to hibernating myocardium [15, 16]. Hibernating

myocardium is a form of IHD in which left ventricular (LV) contraction is depressed, but ischemic myocardium remains viable [14]. Hibernating myocardium is the underlying cause of a significant proportion of HF with reduced ejection fraction (HFrEF) [25].

Cardiomyocytes metabolic reprogramming, characterized by a shift from fatty acids to glucose as the preferential substrate, is a common phenomenon in different forms of HFrEF, including hibernated myocardium [6, 29]. In a mouse model of HF, metabolic switch has shown to be a potential therapeutic target [41]. The lack of large animal models of HF with accompanying metabolic switch confirming the rodent preliminary data limits the translational potential of this and future strategies.

Here we present the generation of a pig model of hibernating myocardium with superimposed metabolic switch

✉ Borja Ibanez
bibanez@cnic.es

Extended author information available on the last page of the article

and deep phenotyping by serial multimodality imaging. This model can be useful for the HF community to test potential therapeutic targets before entering the clinical arena.

Methods

Study design

All animal studies were conducted at the CNIC and approved by the local CNIC Institutional Animal Research Committee, and the Regional Animal Research Committee. All animal procedures conformed to EU Directive 2010/63EU and Recommendation 2007/526/EC regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Study protocol is represented in Fig. 1. Hibernating myocardium was induced in Yucatan Minipigs (35–45 kg) by surgically placing a casein ameroid in the proximal left anterior descending (LAD) coronary artery. Casein ameroid generates a slowly progressive inward stenosis as it is hydrated.

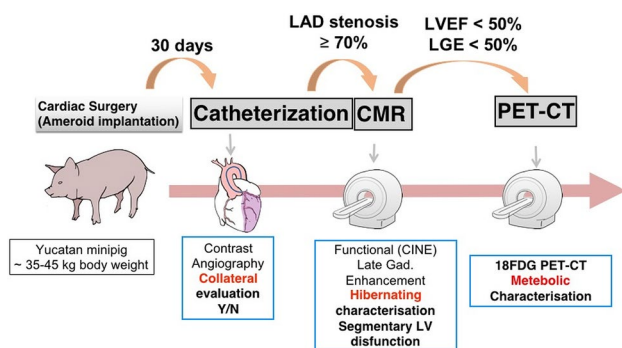


Fig. 1 Study protocol

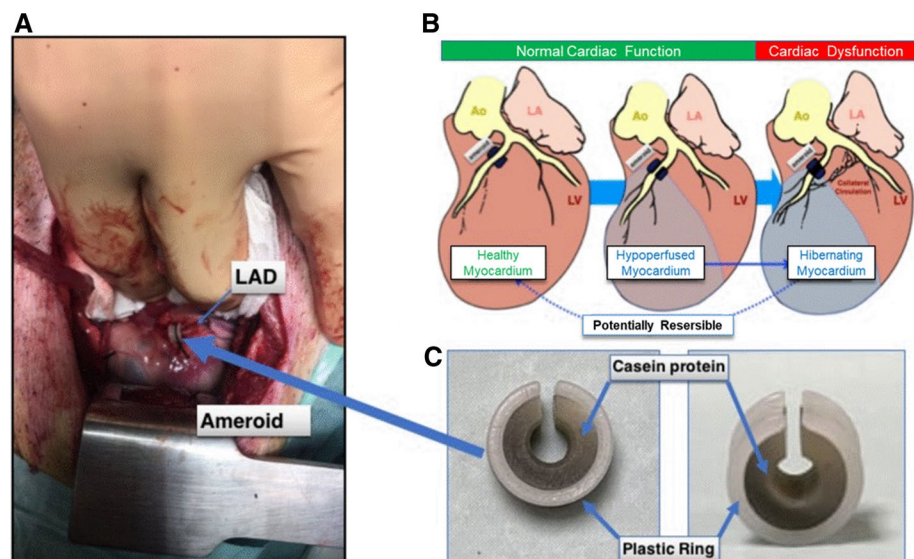
First follow-up angiography was scheduled 30 days after surgery. Angiography was repeated every 2 weeks until severe stenosis ($\geq 70\%$) and collateral circulation development was documented. At this time, pigs were scheduled for cardiac magnetic resonance (CMR). On CMR, hibernating myocardium was defined by the presence of reduced LVEF ($< 50\%$) in the absence of transmural late gadolinium enhancement (LGE $< 50\%$ of transmural). Pigs with evidence of hibernating myocardium were scheduled for ^{18}F -Fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography (^{18}F FDG-PET/CT) to evaluate the presence of metabolic switch in the LV anterior wall.

Surgical ameroid implant protocol

Animals were sedated by intramuscular injection of ketamine (20 mg/kg), xylazine (2 mg/kg), and midazolam (0.5 mg/kg). Then they were transferred to the operating room and placed on left lateral decubitus. Anesthesia was maintained with inhaled sevoflurane (3–4%) throughout the procedure. Continuous intravenous fentanyl solution was infused as analgesia during the surgery. A left minithoracotomy was performed through the third or fourth intercostal space. Once in the pericardial cavity, the proximal LAD was located. To facilitate the exposure of this artery, a traction point was given on the left atrial appendage with a non-absorbable suture. Subsequently, a fine dissection of the LAD was performed and the ameroid ring implanted around the proximal segment of the artery. Subsequently, the left atrial traction was removed, and hemostasis and flat closure was performed (Fig. 2).

After the procedure, the animal was treated with dual antiplatelet therapy (aspirin plus clopidogrel) for 1 month to prevent LAD thrombosis. In order to try to reduce

Fig. 2 Surgical technique: **a** Surgical field for ameroid implant around the LAD. **b** Representation of the left ventricular systolic dysfunction across time after ameroid implantation. **c** Image of the ameroid showing its components



mortality in the perioperative period, which was presumably of arrhythmic origin, approximately halfway through the protocol (animal number 24) we decided to administer oral metoprolol twice daily for 1 month.

Invasive coronary angiography

Follow-up invasive coronary angiography was performed to evaluate the degree of LAD luminal stenosis induced by the progressive hydration of the ameroid, as well as the presence of collateral circulation. Pigs were sedated as described above, plus an intramuscular injection of buprenorphine (0.01 mg/kg) for analgesia. Through a percutaneous femoral artery access, the left and right coronary arteries were engaged by diagnostic coronary catheters. Iodine contrast was injected, and several fluoroscopy projections were recorded for each coronary artery.

CMR protocol

All studies were performed with a Philips 3-T Achieva Tx whole body scanner (Philips Healthcare, Best, the Netherlands) equipped with a 32-element phased-array cardiac coil. The CMR protocol included a standard segmented cine steady-state free-precession (SSFP) sequence to provide high-quality anatomical references and T1-weighted LGE sequences.

The imaging parameters for the cine SSFP sequence were as follows: field of view (FOV) of 280×280 mm, slice thickness 6 mm with no gaps, repetition time (TR) 2.8 ms, echo time (TE) 1.4 ms, flip angle 45° , cardiac phases = 30, voxel size 1.8×1.8 mm, and number of excitations (NEX) = 3.

LGE imaging was performed 10–15 min after intravenous administration of 0.2 mM/kg gadopentetate dimeglumine contrast agent using a 3D inversion-recovery spoiled turbo field echo sequence (TR/TE/Flip angle = 2.4 ms/1.13 ms/ 10°) with an isotropic resolution of $1.5 \times 1.5 \times 1.5$ mm³ on a FOV of $340 \times 340 \times 320$ mm³ in the FH, LR, and AP directions. Data were acquired in mid-diastole with a 151.2 ms acquisition window. Acquisition was accelerated using a net SENSE factor of 2.25 (1.5×1.5 in the AP and LR directions) with a bandwidth of 853 Hz per-pixel. Inversion time was adjusted before acquisition using a look-locker scout sequence with different inversion times to ensure proper nulling of the healthy myocardium signal. For the analysis, 3D volume was reconstructed in short axis view with a slice thickness of 6 mm. Cardiac quantitative perfusion was estimated using dynamic acquisition with dual-saturation recovery (TS = 20, 80 ms) technique during gadolinium-based contrast administration (0.2 mmol) as previously described [33].

CMR analysis

CMR studies were analyzed by two experienced and independent observers using dedicated software (IntelliSpace Portal, Philips Healthcare, Best, the Netherlands). Briefly, LV cardiac borders were traced in each cine image to obtain LV end-diastolic mass, LV end-diastolic volume (LVEDV), end-systolic volume (LVESV), and LVEF. Wall thickening values for anterior and posterior contractility assessment were obtained as well from cardiac borders tracing. Late gadolinium-enhanced regions were defined as percentage of maximum myocardial signal intensity (full width at half maximum) and quantitatively analyzed. After perfusion map generation, regions of interest were analyzed in the anterior and posterior areas using dedicated software (MR Extended Work Space 2.6, Philips Healthcare).

¹⁸F-FDG- PET/CT protocol

All studies were performed with GEMINI TF 64-slices PET-CT scan (Philips Healthcare, Best, the Netherlands). Animals were fasted 24 h before the exams, having free access to water consumption, and glucose level was normalized to 100–150 mg/dL. Blood drops were drawn, and glucose was quantified using a CONTOURTM PLUS Blood Glucose Monitoring System. If glucose levels were < 100 mg/dL, an intravenous (i.v.) bolus of saline with 50% glucose (5 mL bolus per 10 mg/dL below 100 mg/dL [e.g., 5 mL when glucose was 90–99 mg/dL, 10 mL when glucose was 80–89, etc.]) was given. When glucose levels were > 150 mg/dL, repeated blood draws were done every 15 min while the pig was resting until levels were in the target range. Glucose concentration had to remain in the target range for at least 30 min before radiotracer injection. PET studies were acquired 40 min after i.v. administration of 370 MBq of ¹⁸F-FDG. PET data were collected for 45–60 min with the animals anesthetized as described above and reconstructed. After the PET, an iodine contrast-enhanced prospective ECG-gated cardiac CT was acquired using an X-ray kVp and reconstructed to superpose the anatomical structures to ¹⁸F-FDG distribution. PET-CT studies were analyzed using dedicated software (IntelliSpace Portal, Philips Healthcare, Best, the Netherlands) by placing a ROI in the anterior area and the posterior regions. Values were counts normalized to blood pool (ROI placed in descending thoracic aorta).

Histology

Animals were euthanized by intravenous injection of pentobarbital in overdose (50 mg/kg intravenously). After heart harvest, samples of the left ventricle (anterior-septal and free lateral walls) were collected for histology. Samples were fixed in 4% formalin and then transferred to 70%

ethanol. After paraffin embedding, 4 μ m sections were cut and stained with hematoxylin and eosin.

Statistical analysis

Data are considered continuous variables and results are presented as median and interquartile range. LVEF was represented in a box-plot in the follow-up. Box plots are used to represent LGE extension in percentage, wall thickening, quantitative perfusion and ^{18}F -FDG counts with median as central value and interquartile range as limits.

Results

Mortality associated with model induction

Of 43 pigs undergoing surgical ameroid implant, 24 (56%) died before the first scheduled coronary angiography (30 days after surgery). 15/43 pigs (35%) died within 24 h of cardiac surgery. This mortality was attributed to surgical complications: 6 of 15 died in the operating room due to refractory ventricular fibrillation or coronary rupture and the other 9 were found dead in cage. Two of the 28 survivors (7%) were found dead in cage between day 1 and 7 after surgery. Finally, 7/26 pigs alive at day 7 were found dead in cage before the first scheduled coronary angiography (27%). No casualties were documented in pigs that were alive at day 30. Therefore, overall mortality of this model was 56% (Fig. 3).

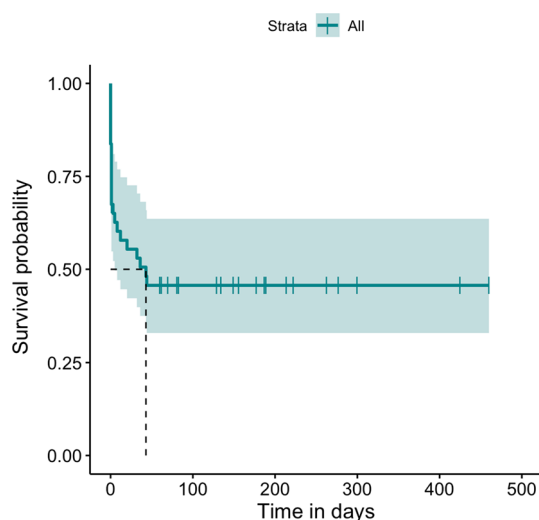


Fig. 3 Time line of mortality associated with the model

Hibernating myocardium phenotyping

Nineteen pigs arrived alive to the first angiography. Only 1 animal had severe LAD stenosis at the first angiography; in the others, severe LAD stenosis was found at the second or third angiography. Mean time to severe LAD stenosis diagnosis was 56 ± 9 days (Fig. 4). Two pigs surviving to first scheduled angiography (day 30) did not show hibernating myocardium: one had normal LVEF and another had low LVEF but transmural extension on LGE-CMR suggestive of absence of viability. 17 of 19 pigs surviving to first scheduled angiography (89%) displayed all features of hibernating myocardium (severe stenosis of the LAD, LVEF < 50% on CMR, absence of transmural delayed enhancement on LGE-CMR, and metabolic switch on PET/CT in 14/17 pigs) (Fig. 5). On CMR, median LVEF of pigs with hibernating myocardium was 35% (IQR 32.5–40.5%) (Fig. 6a). The extent of irreversible injury (LV mass with LGE) was 10% (IQR 8–13%) (Fig. 6b). All pigs with hibernating myocardium had extensive regional wall motion abnormalities (akinesia/hypokinesia of one or more segments of the antero-septal wall [wall thickening 13% (IQR 1.2–21.3%)], with no alterations or mild hypokinesia in the posterior wall [wall thickening 47.5% (IQR 33–69.8%)] (Fig. 6d) and viability on LGE-CMR (Fig. 6b). In terms of quantitative perfusion, it was analyzed in the 17 alive pigs and the mean quantitative perfusion in the anterior wall (hibernated myocardium) was 127.5 (IQR 116.5–140.5) ml/100 g/min and in the posterior wall (remote myocardium) was 193 (IQR 166–211.5) ml/100 g/min (Fig. 6c). To better define the viability of the ischemic myocardium (thus proving its hibernating nature), stress CMR with dobutamine infusion was performed in three animals [35, 36]. Global LVEF

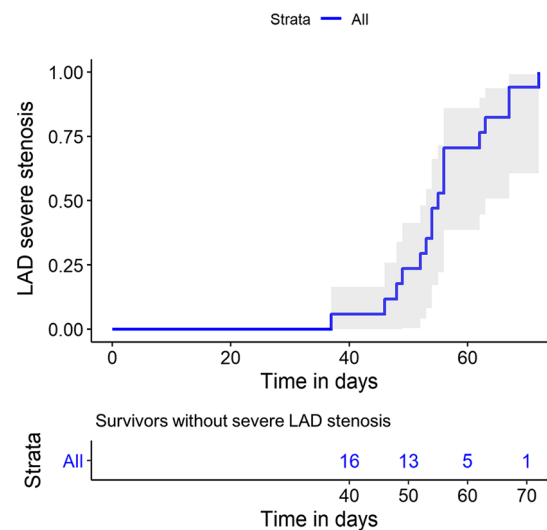


Fig. 4 Kaplan–Meier curve showing time to severe LAD stenosis

Fig. 5 Representative case of hibernating myocardium. **a** Coronary angiography showing severe LAD stenosis (yellow arrow points to the region of ameroid implant, generating severe stenosis). **b** Short-axis slice of late gadolinium enhancement magnetic resonance imaging at medio-ventricular level. Subendocardial delayed enhanced region can be visualized occupying less than 50% of ventricular thickness. **c** ^{18}F -FDG-PET/CT at different projections showing cardiac glucose uptake in the anterior left ventricular wall

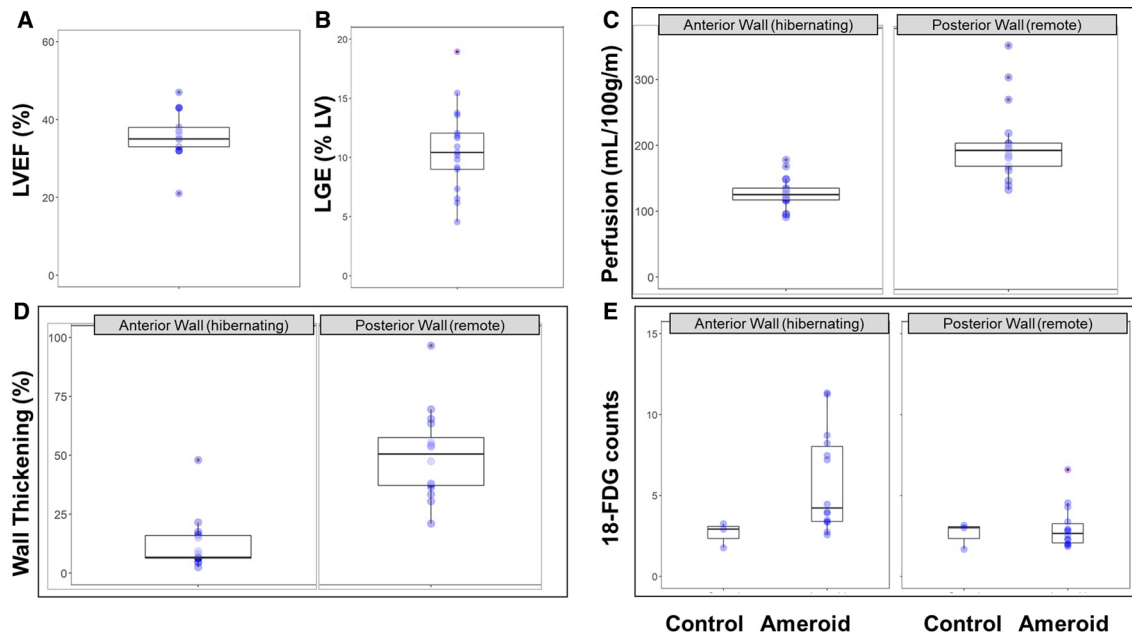
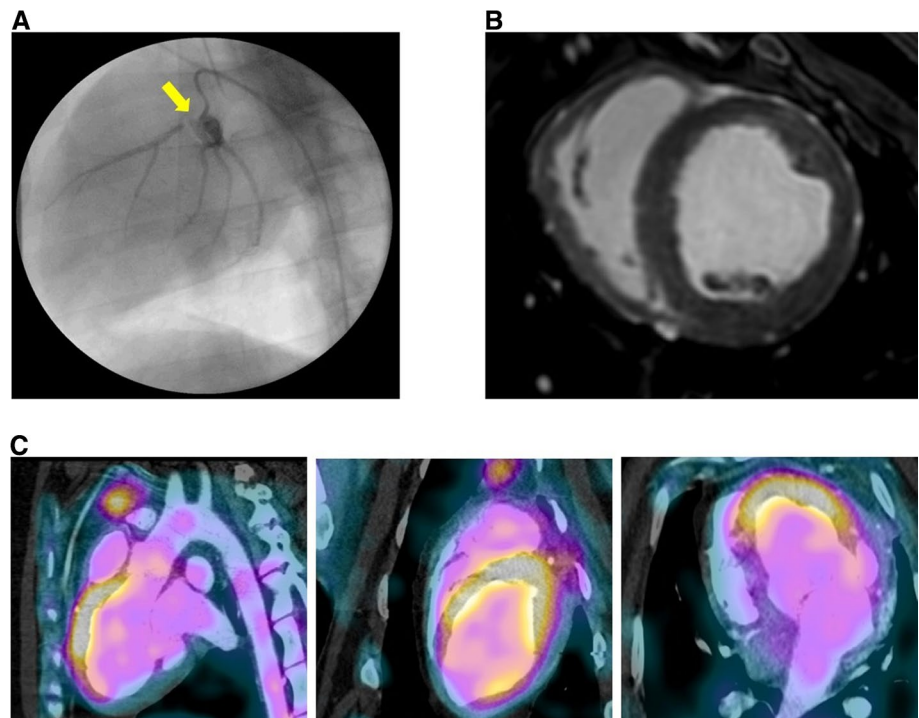


Fig. 6 Median and individual data of imaging-based parameters. Left ventricular ejection fraction (**a**) and late gadolinium enhancement magnetic resonance imaging (**b**). Quantitative perfusion in the ischemic region and in the non-ischemic region (**c**). Wall thickening on CMR in the ischemic region and in the non-ischemic region

(**d**). Glucose uptake on ^{18}F -FDG counts (normalized to skeletal muscle counts) on PET/CT in the ischemic region and in the remote non-ischemic region (**e**). Box-plot represents median, first and third quartile

increased from 35% (IQR 33–37%) at baseline to 64% (IQR 60–67%) under dobutamine infusion. Regional contractile evaluation showed an increase in contractile function both in the hibernating and remote areas: hibernating antero-septal

wall thickening increased from 13.5% (IQR 7.7–19.3%) at baseline to 43.5% (IQR 27.5–67%) under dobutamine infusion. Remote posterior wall thickening increased from 50% (IQR 33.8–67.8%) at baseline to 93.8% (IQR 84.8–103.8%)

under dobutamine infusion. Figure 7 illustrates global and regional systolic improvement in all three animals during dobutamine infusion.

Metabolic switch

From the 17 pigs displaying low LVEF and viability on LGE-CMR, three could not undergo ^{18}F FDG-PET/CT due to technical issues. Three healthy pigs underwent the same ^{18}F FDG-PET/CT protocol and served as controls. Thus, ^{18}F FDG-PET/CT study to evaluate myocardial glucose uptake was performed in 14 pigs. All 14 intervened pigs (100%) displayed an overt increase in glucose uptake in the ischemic, akinetic/hypokinetic LV area, as compared to the remote LV wall (Fig. 6e). Glucose uptake in the 3 controls was homogeneous across the different LV regions and lower than that of the hibernating myocardium of intervened pigs (Fig. 6e).

Histology

One day after the PET/CT study, pigs were euthanized and the heart harvested. Patchy replacement fibrosis was observed in the anterior and lateral LV wall (hibernating regions) but not in the remote myocardium (posterior wall). These areas of fibrosis were mainly found in coronal slice levels 3 and 4 and were accompanied by neovascularization (Fig. 8).

Discussion

Here we have presented the phenotyping of a large animal model resembling most of the features of hibernating myocardium. By using serial, state-of-the-art, multimodality imaging, we show that pigs surviving 45 days after surgical implant of an ameroid around the LAD present severe

coronary artery stenosis with low LVEF and a metabolic switch in the ischemic region.

Large animal models of chronic ischemia with hibernating myocardium are complex to develop due to the challenging interventions requiring multiple specific skills, and the long time needed to reach a full-blown phenotype. These models have been carried out mostly in mice, dogs, and pigs [2, 3, 10, 26, 27]. According to the International Guidelines of Animal Models of Myocardial Ischemia, large animals specifically the pig are the ideal one to test different evaluation techniques for myocardial perfusion and molecular biology underlying myocardial ischemia and cardiac metabolism [5, 17, 20, 24]. The pig offers numerous advantages, including a body mass-indexed heart weight very similar to that of the human and a rapid development of the cardiovascular system (at 3–5 months of age, the pigs have fully developed autonomic nervous and vascular systems [7]). Opposed to other large animal models, pigs have a poorly developed network of coronary collateral circulation, favoring the development of hibernating myocardium upon progressive coronary stenosis [20, 30, 39].

There are two different approaches for the generation of chronic ischemia by inducing coronary artery stenosis: fixed severe stenosis during index surgery [19, 28] and progressive stenosis from surgery onwards [21]. Both techniques generate a flow limitation distal to the coronary artery segment intervened. Of both, the most widely extended technique for the development of hibernating myocardium is the progressive stenosis since it resembles better the development of hibernation in the clinical setting, which usually occurs as a progressive phenomenon. In previous models, the most frequently intervened coronary artery is the left circumflex, since it is more accessible and the duration of intervention is shorter [21, 32]. We decided to intervene the LAD as the amount of myocardium supplied by this artery is larger and

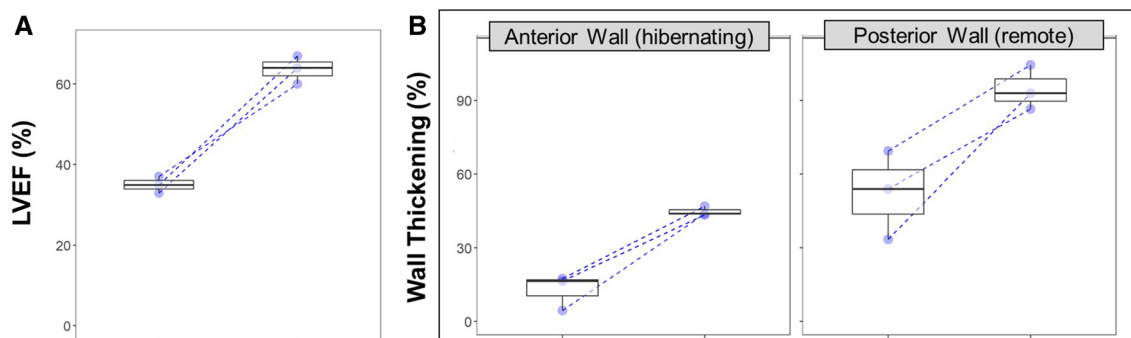


Fig. 7 Contractile reserve of hibernating myocardium with dobutamine infusion. **a** Change in LVEF with dobutamine infusion. **b** Wall thickening change with dobutamine infusion at the antero-septal wall (hibernating myocardium). **c** Wall thickening change with dobutamine infusion at the posterior wall (remote myocardium). Box-plot represents median, first and third quartile. Dots represent individual animals. Pre- and post-dobutamine values from each animal are connected by dashed lines

tamine infusion at the posterior wall (remote myocardium). Box-plot represents median, first and third quartile. Dots represent individual animals. Pre- and post-dobutamine values from each animal are connected by dashed lines

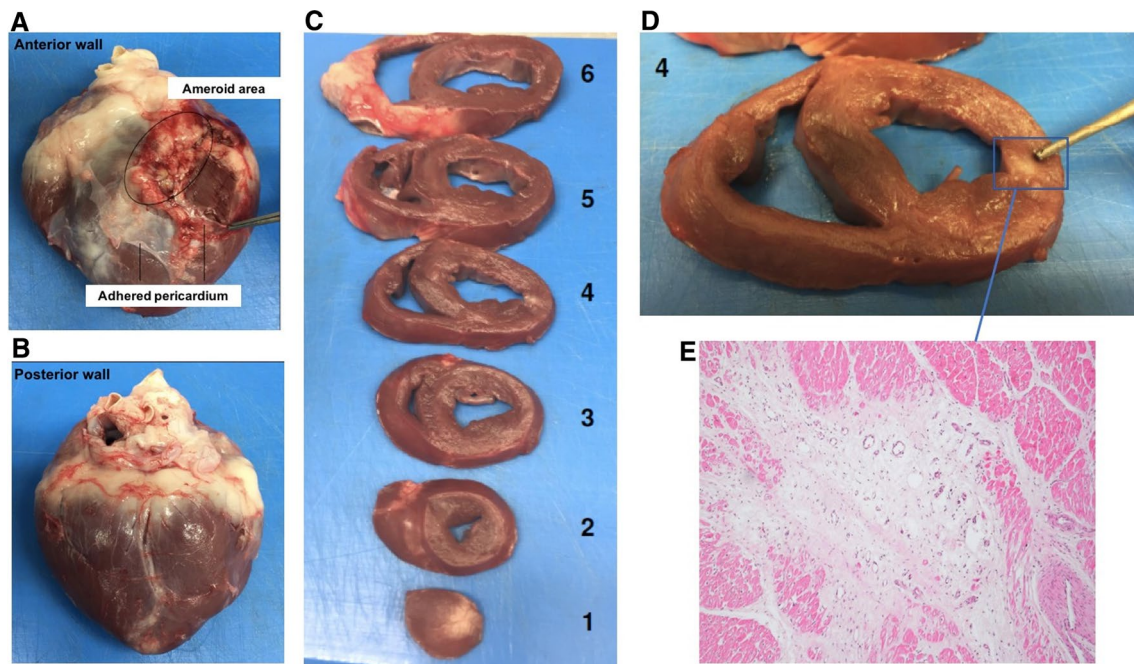


Fig. 8 Histological evaluation of hibernating myocardium. Ex-vivo images from an animal that completed the protocol. **a** Macroscopic view of the LV anterior wall. **b** Macroscopic view of LV posterior wall. **c** Macroscopic view from 6 coronal slices from an operated

heart. **d** Coronal slice number 4 amplified showing minimal fibrosis (blue square) and viability of the LV anterior wall. **e** Microscopic view of the fibrosis area from (**d**)

the chances to induce reduction in global LVEF are higher, as we demonstrated.

The model we presented has some pros and cons compared to others in the literature (mainly targeting the left circumflex artery). The pros include a final phenotype more similar to the human scenario including a large ischemic area, affecting the anterior wall. Cons include a high mortality within the first weeks after intervention: close to 60% of pigs undergoing surgery die before showing a hibernating myocardium. This mortality rate is significantly higher to that reported for left circumflex models (25%) [22, 37, 38, 40]. One reason for the high mortality rate could be the acute thrombotic occlusion of the narrowed LAD. In order to reduce this possibility, we kept pigs under dual antiplatelet therapy for several weeks after surgery. Another potential reason was the larger amount of ischemic myocardium generated in the LAD approach, probably increasing the incidence of malignant arrhythmias; but when we decided to administer metoprolol, there was no impact in the mortality. Other groups have performed an ameroid implant in the LAD with lower mortality rates [11, 22, 38], but the level of the ameroid implant was more distal than that in ours, thus generating a smaller ischemic region.

Myocardial phenotyping of models of hibernated myocardium has been mainly done by echocardiography, thus allowing only a cardiac motion evaluation [9, 19, 22]. To date no study has performed a comprehensive tissue

characterization study like the one presented here. The use of CMR and PET/CT allows a very comprehensive characterization of the ischemic myocardium beyond cardiac contractility. The confirmation of myocardial viability and the demonstration of a metabolic switch clearly show the high translational potential of this model. In physiological conditions, the myocardium uses fatty acids as the main metabolic substrate. A metabolic switch characterized by a change from fatty acids to glucose as the preferred substrate is a condition observed in heart failure from different etiologies, including hibernating myocardium. We used ^{18}F -FDG radiotracer to compare the ischemic and the remote regions in terms of glucose uptake. ^{18}F -FDG is a widespread used radiotracer due to its long half-life (approximately 2 h) and the good quality of the PET images obtained [31]. Despite the fact that we did not measure fatty acids uptake directly, the clear differences in glucose uptake from different myocardial regions are high suggestive of a metabolic switch. There are different tracers used to evaluate beta-oxidation of fatty acids by the myocardium, such as 14-(R,S)-18F-fluoro-6-thia-heptadecanoic acid (FTHA) or 18F-fluoro-4-thia-palmitate (FTP); however, these tracers are difficult to be used in large animal experiments due to the important economic costs [31].

Our long-term ambition is to use this model to test different therapies suited for heart failure in general and for hibernating myocardium in particular. Interventions able

to revert the metabolic switch have been proposed in small animal studies [41]. We plan to perform a preclinical trial in pigs with a metabolic intervention. Furthermore, this model is ideal to test strategies able to induce enhanced neovascularization, such as cell therapy [1, 4], gene therapy, or pharmacological therapies.

Study limitations

The present study has some limitations. The main limitation of this model is the high mortality associated with it before hibernating myocardium is documented. As commented, we have not measured directly fatty acids uptake by the myocardium, and thus the demonstration of metabolic switch is indirect. The evaluation of myocardial viability was performed by the accepted LGE-CMR approach; however, the presence of contractile reserve was only confirmed in three pigs. Pigs were not revascularized to demonstrate the full reversibility of cardiac dysfunction, as it is expected for hibernating myocardium. The surgical revascularization of pigs with an ameroid implanted months before is a very challenging intervention. While previous studies have reported different models of hibernating myocardium [2, 3, 10, 26, 27], thus partially limiting the novelty of our work, ours is the first one to provide a comprehensive longitudinal multimodality evaluation. Our histology analysis is limited and we have not performed electron microscopy to evaluate typical features associated with hibernated myocardium such as glycogen droplets, doughnut mitochondria, and loss of myofibrils quantification [8, 18]. Our model is aimed at serving as a tool to test novel therapeutic interventions in the future, but as presented lacks novel mechanistic insights into the hibernating myocardium condition. Translation of pig studies to humans is complex not only because of the lack of comorbidities in the former, but also because the underlying signal transduction of disease state and that of therapeutic strategies is not necessarily equal [12].

Acknowledgements This study has been partially funded by the Horizon 2020 European Research Area Network on Cardiovascular Diseases (ERA-CVD) Joint Transnational Call “AC16/00021: FAT-4HEART,” by the Spanish Society of Cardiology through a “Translational Research grant 2019,” and by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and the European Regional Development Fund (ERDF) through a FIS grant (Ref # PI16/02110). Imaging phenotyping was partially supported by the Comunidad de Madrid (S2017/BMD-3867 RENIM-CM) and cofunded with European structural and investment funds. The CNIC is supported by the ISCIII, the Ministerio de Ciencia e Innovación and the Pro CNIC Foundation, and is a Severo Ochoa Center of Excellence (SEV-2015-0505).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Javier Sanchez-González is a Philips employee. The rest of authors declare that they have no conflict of interest.


References

- Alvino VV, Fernandez-Jimenez R, Rodriguez-Arabaolaza I, Slater S, Mangialardi G, Avolio E, Spencer H, Culliford L, Hassan S, Sueiro Ballesteros L, Herman A, Ayaon-Albarran A, Galan-Arriola C, Sanchez-Gonzalez J, Hennessey H, Delmege C, Ascione R, Emanueli C, Angelini GD, Ibanez B, Madeddu P (2018) Transplantation of allogeneic pericytes improves myocardial vascularization and reduces interstitial fibrosis in a swine model of reperfusion acute myocardial infarction. *J Am Heart Assoc.* <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006727>
- Bito V, Heinzel FR, Weidemann F, Dommke C, van der Velden J, Verbeken E, Claus P, Bijnsens B, De Scheerder I, Stienen GJ, Sutherland GR, Sipido KR (2004) Cellular mechanisms of contractile dysfunction in hibernating myocardium. *Circ Res* 94:794–801. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000124934.84048.DF>
- Bito V, van der Velden J, Claus P, Dommke C, Van Lommel A, Mortelmans L, Verbeken E, Bijnsens B, Stienen G, Sipido KR (2007) Reduced force generating capacity in myocytes from chronically ischemic, hibernating myocardium. *Circ Res* 100:229–237. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000257829.07721.57>
- Bobi J, Solanes N, Fernandez-Jimenez R, Galan-Arriola C, Dantas AP, Fernandez-Friera L, Galvez-Monton C, Rigol-Monzo E, Aguero J, Ramirez J, Roque M, Bayes-Genis A, Sanchez-Gonzalez J, Garcia-Alvarez A, Sabate M, Roura S, Ibanez B, Rigol M (2017) Intracoronary administration of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improves myocardial perfusion but not left ventricle function, in a translational model of acute myocardial infarction. *J Am Heart Assoc.* <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.005771>
- Botker HE, Hausenloy D, Andreadou I, Antonucci S, Boengler K, Davidson SM, Deshwal S, Devaux Y, Di Lisa F, Di Sante M, Efentakis P, Femmino S, Garcia-Dorado D, Giricz Z, Ibanez B, Iliodromitis E, Kaludercic N, Kleinbongard P, Neuhauser M, Ovize M, Pagliaro P, Rahbek-Schmidt M, Ruiz-Meana M, Schluter KD, Schulz R, Skyschally A, Wilder C, Yellon DM, Ferdinandy P, Heusch G (2018) Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 113:39. <https://doi.org/10.1007/s00395-018-0696-8>
- Braunwald E (2013) Research advances in heart failure: a compendium. *Circ Res* 113:633–645. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.302254>
- Buckley NM, Gootman PM, Yellin EL, Brazeau P (1979) Age-related cardiovascular effects of catecholamines in anesthetized piglets. *Circ Res* 45:282–292. <https://doi.org/10.1161/01.res.45.2.282>
- Cabrera JA, Butterick TA, Long EK, Ziemba EA, Anderson LB, Duffy CM, Sluiter W, Duncker DJ, Zhang J, Chen Y, Ward HB, Kelly RF, McFalls EO (2013) Reduced expression of mitochondrial electron transport chain proteins from hibernating hearts relative to ischemic preconditioned hearts in the second window of protection. *J Mol Cell Cardiol* 60:90–96. <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2013.03.018>
- Caillaud D, Calderon J, Reant P, Lafitte S, Dos Santos P, Couffignal T, Roques X, Barandon L (2010) Echocardiographic analysis with a two-dimensional strain of chronic myocardial ischemia induced with ameroid constrictor in the pig. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 10:689–693. <https://doi.org/10.1510/icvts.2010.232819>
- Canty JM Jr, Klocke FJ (1987) Reductions in regional myocardial function at rest in conscious dogs with chronically reduced regional coronary artery pressure. *Circ Res* 61:II107–116
- Fallavollita JA, Logue M, Canty JM Jr (2001) Stability of hibernating myocardium in pigs with a chronic left anterior descending coronary artery stenosis: absence of progressive fibrosis in

- the setting of stable reductions in flow, function and coronary flow reserve. *J Am Coll Cardiol* 37:1989–1995. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(01\)01250-5](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(01)01250-5)
12. Gedik N, Kruger M, Thielmann M, Kottenberg E, Skyschally A, Frey UH, Cario E, Peters J, Jakob H, Heusch G, Kleinbongard P (2017) Proteomics/phosphoproteomics of left ventricular biopsies from patients with surgical coronary revascularization and pigs with coronary occlusion/reperfusion: remote ischemic preconditioning. *Sci Rep* 7:7629. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07883-5>
 13. Gheorghiadu M, Sopko G, De Luca L, Velazquez EJ, Parker JD, Binkley PF, Sadowski Z, Golba KS, Prior DL, Rouleau JL, Bonow RO (2006) Navigating the crossroads of coronary artery disease and heart failure. *Circulation* 114:1202–1213. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.623199>
 14. Heusch G, Libby P, Gersh B, Yellon D, Bohm M, Lopaschuk G, Opie L (2014) Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet* 383:1933–1943. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60107-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60107-0)
 15. Heusch G, Schulz R (1996) Hibernating myocardium: a review. *J Mol Cell Cardiol* 28:2359–2372. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0229>
 16. Heusch G, Schulz R, Rahimtoola SH (2005) Myocardial hibernation: a delicate balance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H984–999. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01109.2004>
 17. Heusch G, Skyschally A, Schulz R (2011) The in-situ pig heart with regional ischemia/reperfusion—ready for translation. *J Mol Cell Cardiol* 50:951–963. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.02.016>
 18. Holley CT, Long EK, Butterick TA, Duffy CM, Lindsey ME, Stone LH, McFalls EO, Kelly RF (2015) Mitochondrial fusion proteins in revascularized hibernating hearts. *J Surg Res* 195:29–36. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.12.052>
 19. Hughes GC, Post MJ, Simons M (1985) Annex BH (2003) Translational physiology: porcine models of human coronary artery disease: implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. *J Appl Physiol* 94:1689–1701. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00465.2002>
 20. Ibanez B, Aletras AH, Arai AE, Arheden H, Bax J, Berry C, Bucciarelli-Ducci C, Croisille P, Dall'Armellina E, Dharmakumar R, Eitel I, Fernandez-Jimenez R, Friedrich MG, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Kim RJ, Kozierke S, Kramer CM, Salerno M, Sanchez-Gonzalez J, Sanz J, Fuster V (2019) Cardiac MRI endpoints in myocardial infarction experimental and clinical trials: JACC scientific expert panel. *J Am Coll Cardiol* 74:238–256. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.05.024>
 21. Inou T, Tomoike H, Watanabe K, Kikuchi Y, Mizukami M, Kurozumi T, Nakamura M (1980) A newly developed X-ray transparent ameroid constrictor for study on progression of gradual coronary stenosis. *Basic Res Cardiol* 75:537–543. <https://doi.org/10.1007/bf01907835>
 22. Keeran KJ, Jeffries KR, Zetts AD, Taylor J, Kozlov S, Hunt TJ (2017) A chronic cardiac ischemia model in swine using an ameroid constrictor. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/56190>
 23. Khatibzadeh S, Farzadfar F, Oliver J, Ezzati M, Moran A (2013) Worldwide risk factors for heart failure: a systematic review and pooled analysis. *Int J Cardiol* 168:1186–1194. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.11.065>
 24. Lindsey ML, Bolli R, Canty JM Jr, Du XJ, Frangogiannis NG, Frantz S, Gourdie RG, Holmes JW, Jones SP, Kloner RA, Lefer DJ, Liao R, Murphy E, Ping P, Przyklenk K, Recchia FA, Schwartz Longacre L, Ripplinger CM, Van Eyk JE, Heusch G (2018) Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 314:H812–H838. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00335.2017>
 25. Lozano I, Capin E, de la Hera JM, Llosa JC, Carro A, Lopez-Palop R (2015) Diffuse coronary artery disease not amenable to revascularization: long-term prognosis. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 68:631–633. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2015.02.013>
 26. McFalls EO, Kelly RF, Hu Q, Mansoor A, Lee J, Kuskowski M, Sikora J, Ward HB, Zhang J (2007) The energetic state within hibernating myocardium is normal during dobutamine despite inhibition of ATP-dependent potassium channel opening with glibenclamide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H2945–2951. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00012.2007>
 27. McFalls EO, Murad B, Haspel HC, Marx D, Sikora J, Ward HB (2003) Myocardial glucose uptake after dobutamine stress in chronic hibernating swine myocardium. *J Nucl Cardiol* 10:385–394. [https://doi.org/10.1016/s1071-3581\(03\)00431-8](https://doi.org/10.1016/s1071-3581(03)00431-8)
 28. Millard RW (1981) Induction of functional coronary collaterals in the swine heart. *Basic Res Cardiol* 76:468–473. <https://doi.org/10.1007/bf01908345>
 29. Neubauer S (2007) The failing heart—an engine out of fuel. *N Engl J Med* 356:1140–1151. <https://doi.org/10.1056/NEJMra063052>
 30. Patterson RE, Kirk ES (1983) Analysis of coronary collateral structure, function, and ischemic border zones in pigs. *Am J Physiol* 244:H23–31. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1983.244.1.H23>
 31. Peterson LR, Gropler RJ (2010) Radionuclide imaging of myocardial metabolism. *Circ Cardiovasc Imaging* 3:211–222. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.109.860593>
 32. Roth DM, Maruoka Y, Rogers J, White FC, Longhurst JC, Bloor CM (1987) Development of coronary collateral circulation in left circumflex Ameroid-occluded swine myocardium. *Am J Physiol* 253:H1279–1288. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1987.253.5.H1279>
 33. Sanchez-Gonzalez J, Fernandez-Jimenez R, Nothnagel ND, Lopez-Martin G, Fuster V, Ibanez B (2015) Optimization of dual-saturation single bolus acquisition for quantitative cardiac perfusion and myocardial blood flow maps. *J Cardiovasc Magn Reson* 17:21. <https://doi.org/10.1186/s12968-015-0116-2>
 34. Sayago-Silva I, Garcia-Lopez F, Segovia-Cubero J (2013) Epidemiology of heart failure in Spain over the last 20 years. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 66:649–656. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2013.03.012>
 35. Schulz R, Guth BD, Pieper K, Martin C, Heusch G (1992) Recruitment of an inotropic reserve in moderately ischemic myocardium at the expense of metabolic recovery. A model of short-term hibernation. *Circ Res* 70:1282–1295. <https://doi.org/10.1161/01.res.70.6.1282>
 36. Schulz R, Miyazaki S, Miller M, Thaulow E, Heusch G, Ross J Jr, Guth BD (1989) Consequences of regional inotropic stimulation of ischemic myocardium on regional myocardial blood flow and function in anesthetized swine. *Circ Res* 64:1116–1126. <https://doi.org/10.1161/01.res.64.6.1116>
 37. St Louis JD, Hughes GC, Kypson AP, DeGrado TR, Donovan CL, Coleman RE, Yin B, Steenbergen C, Landolfo KP, Lowe JE (2000) An experimental model of chronic myocardial hibernation. *Ann Thorac Surg* 69:1351–1357. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(00\)01130-9](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(00)01130-9)
 38. Tarkia M, Stark C, Haavisto M, Kentala R, Vahasilta T, Savunen T, Strandberg M, Hynninen VV, Saunavaara V, Tolvanen T, Teras M, Rokka J, Pietila M, Saukko P, Roivainen A, Saraste A, Knuuti J (2015) Cardiac remodeling in a new pig model of chronic heart failure: assessment of left ventricular functional, metabolic, and structural changes using PET, CT, and echocardiography. *J Nucl Cardiol* 22:655–665. <https://doi.org/10.1007/s12350-015-0068-9>
 39. Tsang HG, Rashdan NA, Whitelaw CB, Corcoran BM, Summers KM, MacRae VE (2016) Large animal models of cardiovascular disease. *Cell Biochem Funct* 34:113–132. <https://doi.org/10.1002/cbf.3173>

40. Unger EF (2001) Experimental evaluation of coronary collateral development. *Cardiovasc Res* 49:497–506. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(00\)00285-6](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(00)00285-6)
41. Wai T, Garcia-Prieto J, Baker MJ, Merkwirth C, Benit P, Rustin P, Ruperez FJ, Barbas C, Ibanez B, Langer T (2015) Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. *Science* 350:aad016. <https://doi.org/10.1126/science.aad0116>

Affiliations

Juan Martínez-Milla^{1,2} · Carlos Galán-Arriola^{1,3} · Manuel Carnero^{1,4} · Javier Cobiella^{1,4} · Daniel Pérez-Camargo^{1,4} · Víctor Bautista-Hernández^{1,5} · Montserrat Rigol^{3,6} · Nuria Solanes^{3,6} · Rocío Villena-Gutierrez¹ · Manuel Lobo¹ · Jesús Mateo¹ · Jean Paul Vilchez-Tschischke^{1,7} · Beatriz Salinas^{1,8,9,10} · Lorena Cussó^{1,8,9,10} · Gonzalo Javier López¹ · Valentín Fuster^{1,11} · Manuel Desco^{1,8,9,10} · Javier Sanchez-González¹² · Borja Ibanez^{1,2,3} 

¹ Translational Laboratory for Cardiovascular Imaging and Therapy, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), C/ Melchor Fernandez Almagro 3, Madrid 28029, Spain

² Department of Cardiology, IIS-Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

³ Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Madrid, Spain

⁴ Department of Cardiovascular Surgery, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

⁵ Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, Spain

⁶ August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Institut de Malalties Cardiovasculares, Hospital Clínic de Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁷ Department of Cardiology, Complejo Hospitalario Riber Juan Bravo, Madrid, Spain

⁸ Departamento de Bioingeniería e Ingeniería Aeroespacial, Universidad Carlos III de Madrid, Madrid, Spain

⁹ Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain

¹⁰ Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Madrid, Spain

¹¹ Zena and Michael A. Wiener Cardiovascular Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

¹² Philips Healthcare, Madrid, Spain